

JAQUELINE ANDRESSA MACHADO TRENTIN

Produção de Domínios Recombinantes de Semaforina5B e Identificação de seus Ligantes

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de concentração em Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Frohlich
Mercadante

Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2008

“Para alcançar a vitória,
você deve colocar seu talento no trabalho
e seu gênio na sua vida.” **Oscar Wilde**

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

Aos meus pais, Cristina e Aguinaldo, pelo apoio incondicional, carinho e incentivo.

A minha família por tudo que sou.

Ao meu noivo, Carlos Eduardo, por todo o amor e compreensão.

À minha orientadora, Adriana, por acreditar em mim e me conduzir nesta empreitada.

Ao professor doutor Sílvio M. Zanata, por me dar esta oportunidade de ser um de seus alunos e me deixar utilizar seu laboratório.

A Suely, Taysa e Luiz, por terem me ajudado com tudo neste trabalho e pelo enorme auxílio na execução dos experimentos.

Ao Departamento de Bioquímica da UFPR pelos experimentos de espectrometria de massa.

À Ana Maria Camargo e Ana Cristina do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer pela ajuda com os sequenciamentos.

A Michele, Katya e Beth pelos ensinamentos e tudo mais.

Aos meus colegas de laboratório que tornaram essa jornada mais doce e agradável.

Ao professor doutor Sílvio Sanches Veiga, por deixar utilizar seu laboratório de Biologia Molecular.

Aos colegas do laboratório de Matriz Extracelular por toda a ajuda.

RESUMO

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, os neurônios devem fazer contato correto com alvos específicos que normalmente estão muito afastados. Para isso são necessárias vias sinalizadoras que funcionam como guias no correto direcionamento do cone de crescimento do axônio. Tais vias sinalizadoras são constituídas por moléculas que atraem o axônio para o seu alvo e ao mesmo tempo o repele de vias inapropriadas. Um grande número de moléculas sinalizadoras e de seus respectivos receptores, que guiam os axônios para alvos apropriados, tem sido identificado por diferentes sistemas e em vários tipos de organismos. Dentre estas moléculas, as semaforinas (Semas) pertencem a uma grande família de proteínas secretadas ou associadas à membrana, caracterizadas por um domínio semaforina (sema) amino-terminal, envolvidas em vários processos relacionados ao sistema nervoso.

As semaforinas de classe 5 são proteínas transmembrânicas, que contém sete repetições trombospondinas. Dois membros dessa família foram identificados em vertebrados, Sema5A e Sema5B. Na literatura há poucos estudos sobre essa classe específica e a maioria dos trabalhos investigou vários aspectos da Sema5A. Contudo, para Sema5B muitas questões permanecem em aberto, como sua modulação, expressão celular e papéis específicos. Com o intuito de melhor caracterizar a Semaforina5B, decidiu-se expressar alguns de seus domínios em sistema heterólogo: o domínio extracelular (SEMA+PSI) e domínio citoplasmático (CITO). Esses domínios recombinantes podem ser ferramentas úteis para o estudo das funções biológicas da Semaforina 5B. Fragmentos de DNA contendo as seqüências codificadoras destes dois domínios foram amplicados por PCR e inseridos nos vetores de expressão pET28a e pGEX-2T. Estas construções foram transformadas em bactérias DH5 α e os plasmídeos resultantes foram purificados das colônias obtidas. As seqüências das construções foram verificadas e apenas pET28a-CITO apresentou-se correta. Essa construção foi então transformada em *E. coli* BL21 (DE3) e a expressão de $_6$ His-CITO foi analisada. Seguiu-se então a expressão e purificação deste domínio recombinante em resina Ni-NTA-agarose, em condições desnaturantes. A produção de $_6$ His-CITO foi confirmada através de ensaio de “Western blotting”, empregando-se anticorpo anti- $_5$ His. Com a finalidade de se detectar proteínas ligantes do domínio citoplasmático de Sema5B, realizou-se ensaios de “pull down”. Nestes experimentos, extratos de cérebro de camundongo foram incubados com $_6$ His-CITO acoplado à resina Ni-NTA-agarose. As proteínas ligantes foram então separadas através de eletroforese bidimensional e sete “spots” puderam ser identificados através de espectrometria de massa. As proteínas identificadas mais interessantes foram tubulina e actina, pois esse resultado sugere a interação do domínio citoplasmático de Sema5B com proteínas do citoesqueleto. Ensaio de “pull down” também foram realizados para analisar a possibilidade de interações diferenciais de $_6$ His-CITO com proteínas de cérebro de camundongos embriões e adultos. Entretanto, os resultados não indicaram ligantes diferentes nesses dois estágios de desenvolvimento.

ABSTRACT

The proper wiring of axons to correct targets is essential for development of the nervous system. This process is orchestrated by axon guidance molecules that act either as attractants and support growth or as inhibitory signals. Some of these molecules belong to the semaphorins, a family of secreted and membrane-anchored proteins characterized by an amino-terminal semaphorin (sema) domain.

Class 5 semaphorins are membrane-bound proteins, that contain seven carboxy terminal thrombospondin repeats. Recent studies have revealed several aspects of Semaphorin 5A. However, Semaphorin 5B is another member of class 5 and its modulation, cell expression and specific roles have not yet been studied. In order to better characterize Semaphorin 5B we decided to produce two recombinant domains in heterologous system: the SEMA+PSI (extracellular domain) and the cytoplasmic domain of this protein in heterologous system. These recombinant domains could be useful tools to study the biological roles of Semaphorin 5B. The DNA fragments containing nucleotides coding for the Sema domain and for the cytoplasmatic tail of Sema5B were amplified by PCR from mouse brain cDNA and cloned into pET28a and pGEX-2T vectors. The resulted clones were transformed and amplified in *E. coli* DH5 α strain. Plasmid mini-preparations of selected colonies were done and the correct direction and the nucleotide sequence of the insert were verified by automated sequencing. Only pET28a-CITO had the correct sequence. This construct was then transformed into *E. coli* BL21 (DE3) strain and the expression of the recombinant cytoplasmic domain of Sema5B ($_6$ His-CITO) was analysed. This domain was then expressed in large-scale and purified by immobilized-metal affinity chromatography (IMAC) under denaturing conditions. The production of the recombinant domain was confirmed in immunoblotting assays using anti-His-tag antibody. To detect proteins that bind to the cytoplasmic domain of Sema5B, we did pull-down assays. In these experiments, mouse brain extracts were loaded into a affinity column of recombinant domain coupled to Ni-NTA-agarose. The ligands were eluted and separated in a bidimensional eletrophoresis. Seven spots were identified by mass spectrometry. Tubulin and actin were the most interesting ligands identified. The results suggest that the cytoplasmic domain of Sema5B interacts with cytoskeletal proteins. Pull-down assays were also done in order to analyse differential $_6$ His-CITO ligands in embryo mouse brain and adult mouse brain. However, it was not possible to visualized differents binding proteins in these two developmental stages.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA – Albumina sérica bovina
DMSO – Dimetilsulfóxido
DTT – Ditionitroreitol
g – Gramas
GST – Glutathione S-transferase
h – hora
IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa – Quilodáton
kg – Quilograma
M – Molar
MALDI-TOF – Dessorção e Ionização com Laser Assistida por Matriz-Tempo-de-vôo
mg – Miligrama
min. – minuto
ml – Mililitro
mM – Milimolar
 μ g – Micrograma
 μ l – Microlitro
 μ M – Micromolar
nm – nanômetro
nt – nucleotídeo
pb – Pares de base
PBS – Solução salina tamponada com fosfato
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PMF – Impressão digital de massa de peptídeo
PMSF – Fenilmetilsulfonil fluoreto
PrPc – Proteína prion celular
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase com a utilização da enzima transcriptase reversa
Tris – Tris(hidroximetil)amino metano

LISTA DE TABELAS

TABELA I – Resultado do seqüenciamento dos clones obtidos.....	38
TABELA II – Resultado da espectrometria de massa dos spots obtidos na eletroforese bidimensional.....	46
TABELA III – Funções das proteínas identificadas por espectrometria de massa.....	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA I – Esquema representativo das oito classes de semaforinas.....	12
FIGURA II – Representação das interações identificadas entre as Plexinas e as Semaforinas.....	14
FIGURA III – Representação esquemática da Semaforina5B.....	17
FIGURA 1 – PCR do domínio CITO.....	34
FIGURA 2 – Padronização da amplificação do domínio SEMA+PSI com DMSO.....	35
FIGURA 3 – PCR do domínio SEMA+PSI padronizado com DMSO.....	35
FIGURA 4 – PCR de colônia para confirmar presença e orientação do inserto.....	37
FIGURA 5– Mini expressão da proteína recombinante His6CITO em sistema heterólogo em <i>E.coli</i>	39
FIGURA 6 – Purificação da proteína recombinante 6HisCITO em condições nativas.....	41
FIGURA 7 – Purificação da proteína recombinante 6HisCITO em condições desnaturantes.....	43
FIGURA 8 – Ensaio de “pull-down”.....	44
FIGURA 9 – Ensaio de “pull-down” em gel bidimensional.....	46
FIGURA 10 – Ensaio “pull-down” embrião e adulto.....	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 A família das Semaforinas e seu envolvimento na navegação axonal.....	11
1.2 Semaforinas de classe 5.....	16
2 JUSTIFICATIVA.....	21
3 OBJETIVOS.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Construções dos vetores para a expressão dos domínios da Semaforina 5B.....	23
4.1.1 Obtenção do cDNA codificante de semaforina 5B.....	23
4.1.2 Preparação dos insertos Sema+PSI e CITO.....	24
4.2 Preparação dos vetores.....	25
4.2.1 Ligação entre insertos e vetores.....	26
4.3 Transformação dos produtos de ligação (eletroporação) e PCR de colônia para verificar presença do inserto.....	26
4.4 Expressão e purificação do domínio citoplasmático de semaforina 5B em sistema heterólogo.....	27
4.4.1 Transformação em E. coli BL21 (DE3) quimiocompetentes.....	27
4.4.2 Expressão de ϵ His-CITO em pequena escala (Mini-Expressão).....	28
4.4.3 Expressão e purificação de 6His-CITO em larga escala.....	28
4.5 Ensaio de “Western blotting” utilizando anticorpo anti His-tag.....	30
4.6 Ensaio de pull-down usando ϵ His-CITO imobilizada em resina de Ni-NTA-Agarose.....	30
4.6.1 Preparo dos extratos de cérebros de camundongos.....	30
4.6.2 Ensaio de pull-down.....	31
4.7 Eletroforese Bidimensional, Espectrometria de Massa (MALDI-TOF) e Identificação das Proteínas por PMF (“Peptide Mass Fingerprinting”).....	31
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Construções dos vetores para a expressão dos domínios da Semaforina 5B.....	34
5.2 Expressão e purificação das construções da proteína Semaforina 5B.....	38
5.3 Ensaios de “pull down” com a proteína recombinante ϵ His-CITO.....	44
6 DISCUSSÃO.....	49
7 PERSPECTIVAS.....	58
8 CONCLUSÕES.....	59
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
10 ANEXO.....	65

1 INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, o neurônio necessita navegar por um terreno constituído por diversos tipos celulares, processos neuronais e moléculas da matriz extracelular. Tal navegação é observada não só durante o desenvolvimento, mas também em processos regenerativos e patológicos do sistema nervoso, e é mediada por uma infinidade de interações protéicas. A informação que direciona o crescimento do axônio é captada e interpretada por uma estrutura sensorial altamente móvel localizada na extremidade mais distal do axônio, nomeada de cone de crescimento. Moléculas específicas que direcionam o crescimento axonal ligam-se a receptores na superfície do cone de crescimento e ativam vias de sinalização intracelular (WIT & VERHAAGEN, 2003). Um grande número de moléculas sinalizadoras e de seus respectivos receptores, que guiam os axônios para alvos apropriados, tem sido identificado por diferentes sistemas e em vários tipos de organismos (MUELLER, 1999). Estas moléculas, tanto atraentes como repelentes, incluem moléculas mediadoras através de contato, normalmente envolvidas no contato célula-célula, e moléculas secretadas. Muitas moléculas apresentam bifuncionalidade, ou seja, atuam de forma dual: como quimioatrativas ou quimiorrepelentes. Essa diferença de função é dependente de uma variedade de fatores que incluem: o estado intracelular do cone de crescimento, expressão diferencial de complexos receptores e a relação entre as diferentes cascatas de sinalização intracelulares (HUBER *et al.*, 2003).

Dentre as mais importantes famílias de moléculas sinalizadoras e receptoras que regulam o direcionamento axonal encontram-se os receptores do tipo tirosino-quinase (SCHLESSINGER, 2000) e tirosino-fosfatase; as moléculas de adesão celular pertencentes à família das imunoglobulinas (KAMIGUCHI & LEMMON, 2000); as caderinas (RANSCHT, 2000); as plexinas e neuropilinas, consideradas como receptores prototípicos de semaforinas (SEMAs) (TAMAGNONE & COMOGLIO, 2000); as semaforinas (WIT & VERHAAGEN, 2003); as netrinas e os receptores de netrinas (KENNEDY, 2000; PÜSCHEL, 1999b) e a família Robo e os seus receptores (GIGER & KOLODKIN, 2001).

1.1 A família das Semaforinas e seu envolvimento na navegação axonal

Existem vários mecanismos e moléculas que guiam os axônios na direção de alvos específicos, tanto no desenvolvimento como no processo de maturação e regeneração do sistema nervoso (PATEL & VAN VACTOR, 2002; MUELLER, 1999; TESSIER-LAVIGNE & GOODMAN, 1996). Entre os mecanismos existentes, algumas famílias de proteínas atuam como fatores de direcionamento axonal, provendo informações que permitem o encontro correto entre processos neuronais e alvos específicos do sistema nervoso.

Dentre estas moléculas, as semaforinas (SEMA) pertencem a uma grande família de proteínas secretadas ou associadas à membrana, sendo muitas dessas proteínas envolvidas na navegação axonal, fasciculação, ramificação e formação de sinapses, atuando como inibidores ou quimiorrepelentes (KOLODKIN *et al.*, 1992; MATTHES *et al.*, 1995). Porém estudos recentes indicam que as semaforinas também podem influenciar a navegação axonal realizando quimioatração (PASTERKAMP *et al.*, 2003).

A família SEMA inclui pelo menos vinte membros diferentes em vertebrados e três em invertebrados. Até o presente momento, as semaforinas foram descritas como moléculas ligantes que atuam sobre determinados receptores como as plexinas, neuropilinas, Off-track, receptor tirosino-kinase Met, CD-72, Tim-2 e integrina. (WIT & VERHAAGEN, 2003). Todas as semaforinas contêm um domínio amino-terminal extracelular de cerca de 500 aminoácidos nomeado domínio semaforina (SEMA) contendo 17 cisteínas altamente conservadas e uma região carboxi-terminal classe-específica que pode conter motivos adicionais.

As semaforinas também diferem com respeito à sua topologia, podendo ser secretadas, transmembrânicas ou ancoradas à superfície celular por glicosilfosfolinositol (GPI) (RAPER; 2000).

Estas características estruturais juntamente com a análise filogenética permitiram a designação de 8 classes, onde todas as semaforinas conhecidas até o momento podem ser agrupadas (SEMAPHORIN NOMENCLATURE COMMITTEE, 1999). Semaforinas classe 1 e classe 2 são encontradas em invertebrados; classes

3 a 7 estão presentes em vertebrados, e uma classe final (classe V) são proteínas codificadas por vírus. As diferenças estruturais entre as oito classes da família Semaforina estão representadas na figura I.

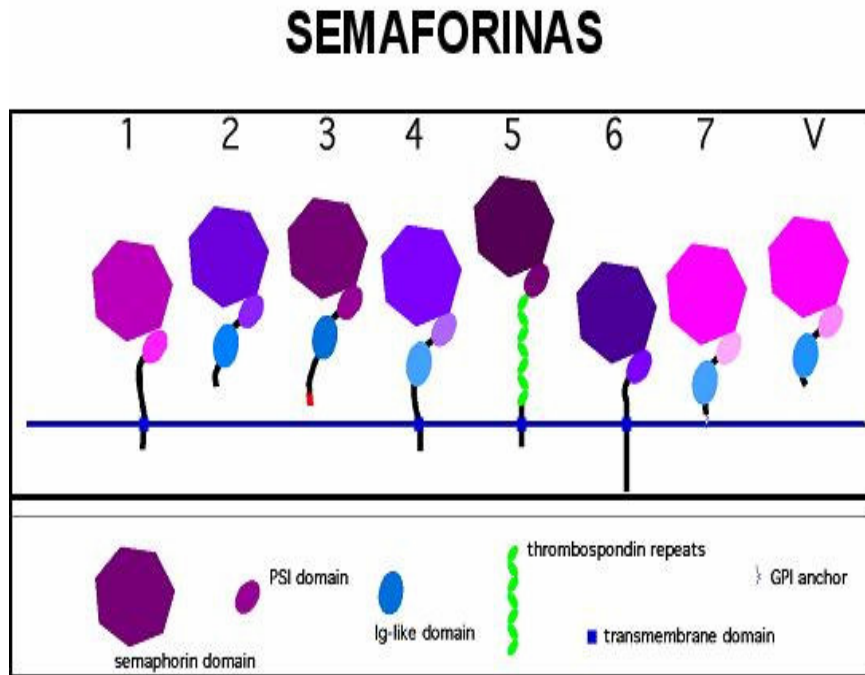
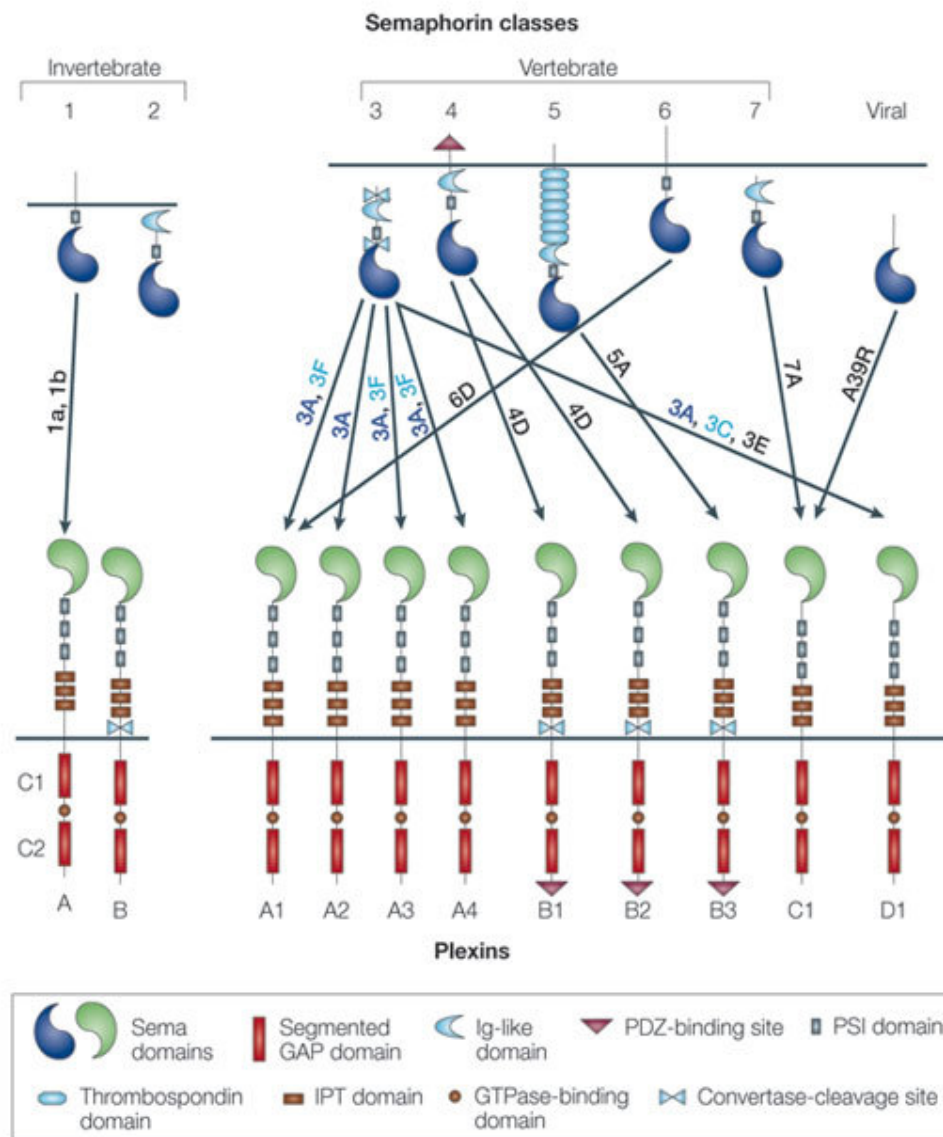


Figura I: Esquema representativo das oito classes de semaforinas: Pode ser visto que cada classe apresenta uma composição de domínios diferente. As Semas das classes 2, 3 e V são secretadas; as das classes 1, 4, 5 e 6 possuem um domínio que atravessa a membrana; as de classe 7 são ancoradas na superfície celular via GPI (glicosil-fosfatidil-inositol). Adaptado de <http://www.uni-muenster.de/Biologie.AllgmZoo/Gruppen/Pueschel/axonguidance.html>

Os receptores característicos da Semaforinas são as Plexinas. Nove tipos de plexinas já foram identificados em mamíferos e classificados em quatro classes distintas (classes A-D), sendo que seqüências relacionadas também foram encontradas em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (WINBERG *et al.*, 1998). Plexinas são proteínas transmembrânicas cujo domínio extracelular rico em cisteína compartilha regiões de homologia com receptores para fator de cicatrização. O domínio extracelular das plexinas contém cerca de 500 aminoácidos correspondentes ao domínio semaforina. Deve-se ressaltar que este último apresenta-se relacionado de forma distante ao domínio Sema das Semaforinas. A

região citoplasmática contém uma sequência de aproximadamente 600 aminoácidos, altamente conservada entre as diferentes plexinas, apresentando similaridade de sequência a proteínas ativadoras de Ras GTPase (GAPs) (SEMAPHORIN NOMENCLATURE COMMITTEE, 1999; ROHM *et al.* 2000b, OSTER *et al.* 2003). Evidências na literatura (ROHM *et al.*, 2000a; ZANATA *et al.*, 2002) apontam que as plexinas podem possuir atividade GAP intrínseca que é essencial para sua habilidade de induzir colapso do cone de crescimento e regular diretamente a atividade de pequenas GTPases, como Rnd1 e RhoD. Semaforinas secretadas (classe 3) não se ligam diretamente a plexinas; estas últimas se associam com neuropilinas, formando um receptor heterodimérico para estas semaforinas (OSTER *et al.*, 2003). Contudo, as plexinas provavelmente são os receptores comuns protótipos das semaforinas, enquanto o requerimento de proteínas auxiliares como as neuropilinas podem representar um caso especial para semaforinas classe 3 (RAPER, 2000). As interações já caracterizadas entre as diferentes plexinas e os vários membros das Semaforinas estão esquematizadas na figura II.

Muitos estudos sobre a sinalização mediada por Semaforinas focaram-se em como a ativação de Plexinas regulam as mudanças que ocorrem no citoesqueleto e provocam um sinal repulsivo (revisado em HALLORAM & WOLMAN, 2006). Uma forma secretada de Semaforina, Semaforina 3A (Sema3A), é sintetizada como um precursor inativo, tornando-se repulsiva para neuritos sensoriais e simpáticos após processamento proteolítico (ADAMS *et al.*, 1997). A exposição de Sema 3A aos cones de crescimento de axônios induz a uma dramática redistribuição dos filamentos de F-actina resultando no seu colapso. Contudo os eventos posteriores na cascata de transdução de sinal que traduz os sinais desencadeados a partir da interação dos fatores quimiossolúveis com seus receptores e que leva às modificações do citoesqueleto, não são completamente conhecidos (CASTELLANI & ROUGON, 2002).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura II: Representação das interações identificadas entre as Plexinas e as Semaforinas. Retirada de KRUGER et al., 2005.

Sabe-se que a família das proteínas ligadoras de GTP – ou família Rho GTPases faz parte da maquinaria capaz da transdução dos sinais extracelulares desencadeados pelas Semas (CASTELLANI & ROUGON, 2002). As Rho GTPases são pequenas proteínas que controlam uma ampla variedade de vias de transdução

de sinal em células eucarióticas. Possuem papel central na reorganização do citoesqueleto de actina, e há indícios de que estas proteínas influenciam a polaridade celular, dinâmica dos microtúbulos, vias de transporte e atividade de fatores de transcrição (ETIENNE-MANNEVILLE & HALL, 2002). As proteínas da família Rho ciclam entre uma forma ativa (ligada a GTP) e inativa (ligada a GDP). A ativação e inativação podem ser controladas por GEFs (“guanine nucleotide exchange factors”) que catalisam a troca de GDP por GTP, isto é, ativam as proteínas Rho; e podem ser controladas por GAPs (“GTPase activating proteins”) que estimulam a hidrólise de GTP, levando à inativação de Rho. As proteínas Rho, de forma geral, possuem atividade GTPásica intrínseca que é apenas acentuada pelas GAPs (ETIENNE-MANNEVILLE & HALL, 2002). Até o momento, cerca de 20 membros de Rho GTPases de mamíferos foram identificados, dentre os quais pode-se citar Rho (A, B e C), Rac (1, 2 e 3), Cdc42, RhoD, RhoG, RhoH/TTF, TC10 e Rnd (1, 2 e 3) (NEGISHI, 2005). As subfamílias Rho e Rac estão envolvidas em vias de transdução de sinais dos receptores para alvos intracelulares, que podem ser proteínas do citoesqueleto, receptores nucleares ou proteínas envolvidas em vias bioquímicas (ETIENNE-MANNEVILLE & HALL, 2002). Plexinas podem possuir atividade GAP intrínseca que é essencial para sua habilidade de induzir colapso do cone de crescimento e regular diretamente a atividade de pequenas GTPases. Plexinas B1 e A1 exercem atividade GAP sobre R-Ras. Esta regula adesão celular e a inativação de R-Ras por plexina pode limitar a adesão celular mediada por integrina. Porém, Plexina B1 requer a ligação direta de Rnd 1, um membro da família Rho GTPase, para exercer sua atividade GAP total (AURANDT et al., 2005).

Alguns trabalhos mostraram que o domínio citoplasmático da Plexina-A1 pode regular diretamente a atividade da small-GTPase Rnd1. Além disso, foi observado um efeito antagonista das GTPases Rnd1 e RhoD no colapso do citoesqueleto induzido pela Sema 3A (ZANATA *et al.*, 2002, ROHM *et al.*, 2000b).

A repulsão dos axônios mediada por Sema3A e Plexina-A1 também requer a participação de Rac1 (JIN & STRITTMATTER, 1997). O papel de Rac1 na via de sinalização da Plexina não gera apenas mudanças no citoesqueleto, mas também causa a inibição da adesão celular mediada por integrinas (revisado em HALLORAM & WOLMAN, 2006).

Sema 4D é uma semaforina transmembrânica que sinaliza através da Plexina B1, sem a participação de Neuropilina (diferente da Sema 3A). A repulsão mediada por Sema 4D também requer a participação de Rac1 e, de forma similar ao que ocorre para Sema 3A, também promove uma inibição de adesão via integrina (revisado em HALLORAM e WOLMAN, 2006).

Como pôde ser visto, os mecanismo de sinalização mediados por alguns membros das Semaforinas, principalmente pela Sema 3A, já estão bem compreendidos. Contudo, como será visto a seguir, muito pouco se sabe sobre as funções fisiológicas e sinalizações envolvidas realizadas pelas semaforinas de classe 5, que são proteínas integrais de membrana. Destas últimas, a Sema 5B é a menos conhecida. Nesse sentido, como será visto, o presente trabalho contribuiu na produção de bioferramentas importantes para o estudo de Sema 5B e também na identificação de interações realizadas por essa proteína.

1.2 Semaforinas de classe 5

A nomenclatura para semaforinas foi revisada em 1999 a fim de se padronizar as diferentes denominações para as proteínas desta família. As semaforinas F e G foram renomeadas para semaforinas 5A e 5B, respectivamente (SEMAPHORIN NOMENCLATURE COMMITTEE, 1999).

As semaforinas 5A e 5B pertencem à classe 5 e foram identificadas em 1996, por ADAMS e colaboradores. Ambas são constituídas de uma região N-terminal extracelular contendo 485 aminoácidos correspondente ao domínio Sema (esse também é conhecido como domínio Sema+PSI; PSI é um peptídeo que possui sequência conservada em **p**lexina, **s**emaforinas e **i**ntegrinas), uma região modular com 408 resíduos compondo sete repetições de uma sequência com alto grau de homologia às repetições encontradas em tromboespondinas 1 e 2 (TSP – type 1 repeat) (ADAMS & TUCKER, 2000), um único domínio hidrofóbico transmembrânico e uma região citoplasmática C-terminal de 80 (Sema 5A) ou 91 aminoácidos (Sema 5B). Esta última é o domínio que apresenta o menor grau de similaridade entre Sema 5A e 5B em comparação a outras regiões destas proteínas (ADAMS *et al*,

1996). A identidade das seqüências de aminoácidos de Sema 5A e 5B é de 58%, enquanto que a similaridade entre elas é de 72% (ADAMS *et al*, 1996).

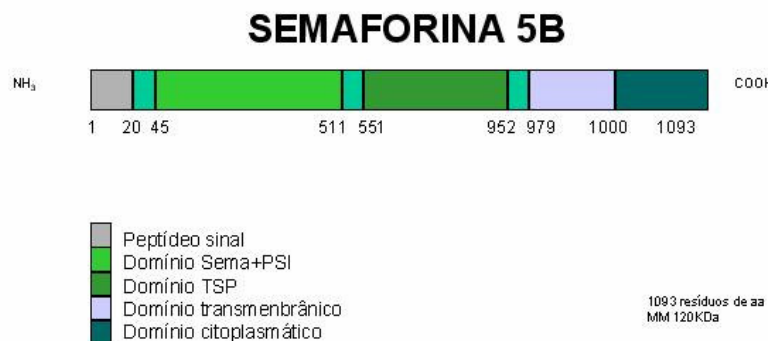


Figura III: Representação esquemática da Semaforina5B

Sema5A e 5B são diferencialmente expressas nos tecidos embrionários e adultos. Análise de “Northern blot” de mRNAs isolados de embriões de camundongos revelou a presença de dois transcritos para Sema5A com 5.5 e 9.4 kb e um único mRNA para Sema5B com 5.9 kb, cuja abundância diminui do dia embrionário 10 (E10) ao nascimento (ADAMS *et al.*, 1996). Em tecidos adultos, além do cérebro, são encontrados três transcritos de Sema5A. Já para Sema5B verificou-se a presença de um único transcrito de 5.9 kb, o qual é expresso exclusivamente no cérebro (ADAMS *et al.*, 1996). Ensaios de hibridização *in situ* em tecidos de camundongos (E9,5) detectou transcritos de Sema5A em células mesodérmicas, esclerótomos, placa lateral mesodérmica, arcos branquiais, membros em desenvolvimento e na notocorda. Enquanto Sema5B é expressa exclusivamente no neuroepitélio ao longo do eixo antero-posterior, e apresenta uma fraca expressão na região mais caudal do tubo neural (ADAMS *et al.*, 1996).

A presença de repetições tipo tromboespondina (TSP) pareadas ao domínio Sema tipicamente inibitório, em semaforinas classe 5, leva a questões sobre o envolvimento destas moléculas com fenômenos de neuritogênese e quimioatração neuronal (ADAMS & TUCKER 2000; ADAMS *et al.*, 1996). Tromboespondinas

constituem uma família de glicoproteínas extracelulares ligantes de cálcio. São abundantemente expressas na matriz extracelular embrionária. Várias proteínas compartilham as repetições do tipo tromboespondina – 1 (TSP-1), sendo muitas destas expressas no sistema nervoso em desenvolvimento. O padrão de expressão e propriedades *in vitro* sugerem funções potenciais para TSP-1 na navegação axonal e migração do cone de crescimento. As repetições de TSP-1 têm sido implicadas na diferenciação, no crescimento de neuritos, no desenvolvimento do sistema nervoso e em processos de regeneração e adesão neuronal (ADAMS & TUCKER, 2000).

É possível que as repetições TSP estejam implicadas na associação de Sema 5A com outras proteínas. Foi visto que Sema 5A liga-se a plexina 3B e que o domínio TSP é importante para essa interação (ARTIGIANI *et al.*, 2004). Nesse mesmo trabalho, os autores usaram Sema 5B como controle e não identificaram ligação desta com as plexinas 3A, 3B ou 3C. A proteína Sema 5B também possui o domínio TSP (ADAMS & TUCKER 2000; ADAMS *et al.*, 1996), porém não está claro se esta molécula está envolvida com neuritogênese, desde que resultados preliminares utilizando Sema 5B recombinante mostraram uma ausência de modulação positiva ou negativa da neuritogênese (PÜSCHEL, 1999a).

KANTOR *et al.* (2004) foram capazes de mostrar que Sema 5A pode desencadear respostas tanto atrativas quanto repulsivas no direcionamento de axônios do fasciculus retroflexus (FR), um feixe de nervos do diencéfalo associado a funções do sistema límbico. Nesse mesmo trabalho, os autores verificaram domínio de repetições TSP da Sema 5A interage fisicamente com a porção glicosaminoglicana de dois tipos de proteoglicanas: as coidroitin sulfato (CSPGs) e as heparan sulfato (HSPGs). A ligação da Sema 5A com CSPG inibe a extensão de axônios FR, enquanto que a interação dessa semaforina com HSPG é necessária para atração axonal. Portanto, a natureza da resposta do cone de crescimento a Sema 5A é dependente do domínio TSP e modulado de acordo com o tipo de proteoglicana presente no ambiente, durante o desenvolvimento (KANTOR *et al.*, 2004).

Ainda quanto à Sema 5A, resultados evidenciaram que essa proteína age de forma inibitória nos axônios do disco óptico e do nervo óptico, mesmo na presença de moléculas atrativas e neuritogênicas, como laminina, L1 e nitrina (OSTER *et al.*,

2003). Nesse mesmo trabalho, os autores não foram capazes de identificar Sema 5B nesses locais do sistema visual.

Mais recentemente, FIORE *et al.*, (2005) desenvolveram uma linhagem de animais nocautes para semaforina 5A e mostraram que esses camundongos são inviáveis, já que os embriões que não possuem o gene para Sema5A não sobrevivem após o dia do desenvolvimento embrionário 12.5 (E12.5). A análise dos embriões nocautes revelou que a estrutura geral do sistema vascular, o desenvolvimento dos tecidos extraembrionários, e o sistema nervoso apresentam-se normais. Contudo observou-se a diminuição no número de vasos de grande diâmetro na região cranial de embriões E10.5. Esses vasos não formam as ramificações adicionais e não estabelecem a sua organização e estruturação normal. Este fenótipo implica que Sema5A não está envolvida na diferenciação de vasos sanguíneos em geral, mas atua na padronização regional da vasculatura. Especificamente as ramificações dos vasos cardinais craniais possuem anormalidades e provavelmente Sema5A está envolvida na estabilização destes vasos sanguíneos (FIORE *et al.*, 2005).

É importante destacar que a classe 5 das semaforinas é a única que possui representantes tanto em vertebrados (Sema 5A e Sema 5B), como em invertebrados. Nesses últimos, Sema-5c, por exemplo, foi identificada em drosófila e parece estar envolvida no comportamento olfativo desses insetos (ROLLMANN *et al.*, 2007).

De fato, as semaforinas transmembrânicas, como as da classe 5, apresentam um aspecto interessante: elas podem funcionar como ligantes e deflagrar um sinal através da ligação de seu domínio extracelular a um receptor de superfície e, ao mesmo tempo, podem agir como receptores e passar um sinal para o interior da célula através de sua cauda citoplasmática, após interação com ligantes específicos (TAMAGNONE & COMOGLIO, 2004).

Um único artigo, bem recente, demonstrou pela primeira vez o papel de Sema5B como uma semaforina inibitória (KENNETH *et al.*, 2007). Nesse trabalho, os autores foram capazes de mostrar que Sema5B induz o colapso do cone de crescimento em gânglios da raiz dorsal de galinha (DRG) através do influxo de Ca^{+2} extracelular. Os resultados indicam que essa resposta é dependente das cascatas de sinalização da fosfatase calcineurina e da protease capaína (KENNETH *et al.*,

2007). Assim, esses resultados evidenciam um provável papel de Sema5B como ligante.

De acordo com o que foi mencionado acima, fica claro que há ainda pouco conhecimento a respeito das semaforinas de classe 5, sobretudo quanto à Sema 5B. Como foi visto, os artigos que foram publicados sobre as semaforinas de classe 5 elucidaram alguns aspectos importantes de Sema 5A, mas com relação a Sema 5B poucos resultados foram obtidos. Assim, para Sema 5B várias questões precisam ser abordadas. Qual é o receptor de Sema 5B? Quais são as funções desempenhadas por Sema 5B? Ela tem função atrativa ou repulsiva? A caracterização bioquímica de Sema 5B, bem como a identificação de seus parceiros moleculares, serão de grande utilidade para o entendimento de processos importantes, como o desenvolvimento e a regeneração do sistema nervoso.

Para tentar responder algumas dessas perguntas, o trabalho em questão pretende produzir domínios recombinantes de Sema 5B, ferramentas que serão úteis no estudo dessa proteína em particular.

2 JUSTIFICATIVA

Como pôde ser visto, a Semaforina 5B é um membro pouco estudado da família das Semaforinas. O fato de Sema5B ser uma proteína integral de membrana sugere que ela pode estar envolvida tanto na sinalização extracelular (funcionando como ligante) como na sinalização intracelular (funcionando como receptor). Para investigar esses possíveis papéis de Sema5B foi necessário primeiro construir ferramentas específicas para este estudo, já que esses reagentes ainda não se encontram padronizados ou disponíveis comercialmente. Nesse sentido, decidiu-se produzir em sistema heterólogo (bactérias) os domínios SEMA+PSI (domínio extracelular de Sema5B) e CITO (domínio intracelular de Sema5B). Estes domínios recombinantes poderão ser úteis em vários projetos do grupo e, no presente trabalho, um dos objetivos foi usá-los em ensaios de ligação *in vitro* para a identificação de proteínas ligantes de Sema5B. A procura por ligantes protéicos desta molécula pode nos trazer pistas valiosas sobre a sua participação em processos fisiológicos e patológicos relacionados ao sistema nervoso central. Além disso, este trabalho irá participar da implementação e padronização de várias técnicas de biologia molecular no laboratório.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

1. Construção de vetores para a expressão de domínios de Semaforina 5B em bactérias: a) domínio SEMA+PSI em pGEX-2T; b) domínio citoplasmático (CITO) em pGEX-2T; c) domínio SEMA+PSI em pET28a; d) domínio CITO em pET28a.
2. Expressão dos domínios da proteína Sema5B (citados acima) em sistema heterólogo recombinante de *E. coli* e sua purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC) ou em glutathione-Sepharose.
3. Utilização dos domínios recombinantes em ensaios de ligação *in vitro* (ensaios de pull down) para identificação dos parceiros moleculares da semaforina 5B. Essa identificação será feita através da separação dos ligantes em eletroforese bidimensional, seguida por espectrometria de massa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Construções dos vetores para a expressão dos domínios da Semaforina 5B

4.1.1 Obtenção do cDNA codificante de semaforina 5B

Para obter o cDNA codificante das seqüências dos domínios específicos da semaforina 5B, domínio extracelular (domínios “Semaforina” e PSI- SEMA+PSI – 133 - 1649 bp) e do domínio intracelular citoplasmático (CITO - 2998 a 3282 bp), extraiu-se o RNA total de quinhentos miligramas de cérebro de camundongos P5 (cinco dias pós-natos) utilizando o reagente TRIzol (Quiagen), como indicado pelo fabricante. Um micrograma desse RNA foi usado para a produção de cDNA. Para isso utilizou-se a transcriptase reversa Improm II (Promega) e oligo dT (Promega) conforme especificações do fabricante. Tendo em mãos o cDNA, as seqüências codificantes para os domínios de interesse de Semaforina 5B foram amplificadas por PCR (“Polimerase Chain Reaction”) usando iniciadores (oligonucleotídeos) especialmente desenhados para amplificá-las. As concentrações de enzima (Taq Polimerase), sais, iniciadores e dNTPs foram baseadas em protocolos descritos por SAMBROOK & RUSSEL, 2001.

Os oligonucleotídeos utilizados permitiram a amplificação dos domínios específicos da Semaforina 5B. Esses oligonucleotídeos possuem em sua seqüência sítios de enzimas de restrição que depois foram utilizados para a inserção dos fragmentos de interesse nos vetores de expressão.

Para o domínio SEMA+PSI, foi utilizado o seguinte par de iniciadores:

	<i>EcoRI</i>	<i>NdeI</i>	
	-----	-----	
“Forward” SEMA+PSI -	5’GT GAA TTC AT	CAT ATG CAC CCC ATC GTC	
GCC TTT G3’			
	<i>EcoRI</i>	<i>NdeI</i>	
	-----	-----	
“Reverse” SEMA+PSI -	5’CC GAA TTC C CAT ATG TCA CCG TGT CAC ATT TCG		
TAC AGG3’			

O sítio *EcoRI* será digerido no fragmento para a clonagem no vetor pGEX2T; e o sítio *NdeI* será digerido para clonagem no vetor pET28a.

As condições da reação de PCR para a amplificação do domínio SEMA+PSI foram: 95° C por 2 minutos e 30 segundos; (95° C – 45 s; 58° C – 45 s; 72° C – 2 min e 30 s) esse ciclo foi repetido 35x e 72° - 10 min; gerando um produto com 1516 bp.

Para o domínio CITO, foi utilizado o seguinte par de iniciadores:

```

              BamHI      NdeI
              -----
“Forward” CITO - 5’CG GGA TCC CAT ATG TCT TGC CAG CAC TGC
CAG C3’

              BamHI
              -----
“Reverse” CITO - 5’CG GGA TCC TCA GCT GTT GGG GAA ACA GCG
CTG TCC AGG T 3’

```

O sítio *Bam* HI será digerido no fragmento para a clonagem no vetor pGEX2T e os sítios *NdeI* e *Bam* HI serão digeridos para clonagem no vetor pET28a.

As condições da reação de PCR para a amplificação do domínio CITO foram: 95° C por 2 minutos e 30 segundos; (95° C – 45 s; 58° - 45 s; 72° C – 2 min e 30 s) esse ciclo foi repetido 35x e 72° - 10 min; gerando um produto com 284 bp.

4.1.2 Preparação dos insertos Sema+PSI e CITO

Dez reações de PCR como as descritas acima para amplificação do cDNA codificador dos domínios Sema+PSI e CITO foram realizadas e seus produtos extraídos do gel, após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo 0,5µg/ml. Para a purificação das bandas do gel utilizou-se o kit QIAquick Gel Extraction (Quiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Os insertos foram então digeridos com as enzimas de restrição conforme os sítios inseridos pelos iniciadores (ver item anterior). Brevemente, para estas digestões foram usadas 5-10 unidades das enzimas. As reações ocorreram por 16 h, a 37 °C, em um volume final de 100 µl. Nova gel-extração foi realizada para retirar as enzimas e os sais presentes nas digestões e que poderiam interferir na próxima etapa (reação de

ligação). Os insertos foram então concentrados e quantificados em centrífuga a vácuo.

4.2 Preparação dos vetores

Os vetores escolhidos para clonagem das seqüências dos domínios de semaforina foram o pET28a (Novagen) e o pGEX2T (GE Life Science).

O vetor pET28a possui o promotor do fago T7, apresenta o gene que confere resistência ao antibiótico kanamicina e origina proteínas de fusão contendo uma cauda N-terminal de seis histidinas. Essa etiqueta de seis histidinas permite a purificação da proteína de fusão por cromatografia de afinidade em uma coluna quelante carregada com Ni^{2+} (Ni-NTA-agarose, Quiagen). Já o vetor pGEX2T possui um promotor tac para indução química e alto nível de expressão, origina proteínas recombinantes em fusão com GST (glutathione-S-transferase) o que permite separá-las por cromatografia de afinidade à Glutathione-Sepharose (GE Life Science).

Usando as enzimas de restrição específicas, foi feita a clivagem de 8 μg de cada vetor para a inserção dos insertos desejados. As digestões foram realizadas em um volume final de 50 μl , com 10 unidades de cada enzima (Fermentas), durante 16 horas, a 37 ° C. Após inativação das enzimas de restrição por aquecimento, os vetores foram ainda destituídos do seu fosfato da região 5', usando a CIAP ("Calf Intestinal Alkaline Phosphatase"-Fermentas) para evitar a re-ligação. Para isso, 3 unidades desta enzima foram adicionadas no próprio tubo onde ocorreu a reação de digestão. A desfosforilação ocorreu durante 1h, a 37 ° C. Após digestão e desfosforilação, os vetores foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo para verificar a eficiência das digestões e a integridade dos plasmídeos. As bandas dos vetores foram purificadas do gel, através do kit QIAquick Gel Extraction (Quiagen), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.2.1 Ligação entre insertos e vetores

Os insertos e os vetores, após digestão, purificação e quantificação, foram então unidos numa reação de ligação na proporção de três moléculas de inserto para cada molécula do vetor, partindo-se de 50ng de plasmídeo. Duzentas unidades da enzima ligase (New England BioLabs) foram utilizadas para cada reação de ligação (volume final de 10µl), as quais ocorreram durante 16 horas, a 16°C. Reações de ligação somente com cada vetor, sem a adição do respectivo inserto, também foram realizadas como controle. As reações foram então precipitadas com acetato de sódio e etanol e ressuspendidas em 5µl de água (um volume duas vezes menor que o volume inicial das ligações). Esta precipitação tornou-se necessária para concentrar os produtos de ligação e para retirar o sal da reação e permitir uma maior eficiência durante a eletroporação (ver protocolo a seguir).

4.3 Transformação dos produtos de ligação (eletroporação) e PCR de colônia para verificar presença do inserto

Os produtos das ligações pET28a-SEMA+PSI, pET28a-CITO, pGEX2T-SEMA+PSI e pGEX2T-CITO foram então transformados em bactérias eletrocompetentes. Quarenta microlitros de bactérias *E. coli* DH5α eletrocompetentes (Sambrook & RUSSEL, 2001) receberam 1µl de cada reação de ligação (após a precipitação) e foram submetidos a uma diferença de potencial de 1.40 kV, para a introdução do DNA na célula. Após este procedimento, as células permaneceram 1 hora em 1,5ml de meio LB (1% NaCl, 0,5% extrato de levedura, 1% peptona, pH 7,0) a 37° C. As culturas foram sedimentadas, ressuspendidas em 100 µl de meio LB e então plaqueadas em meio sólido (LB-Ágar 17g/l ágar) contendo antibióticos apropriados para cada vetor nas concentração de 100µg/ml de ampicilina para as construções no pGEX2T e de 50µg/ml de kanamicina para as construções no pET28a.

Várias das colônias obtidas foram então, cada uma delas, inoculadas em 50 µl de LB/Amp ou LB/Kana. Um microlitro destas suspensões de células foi utilizado

como molde em uma reação de PCR (volume final de 10 μ l) com iniciadores específicos para os fragmentos codificadores dos domínios de Sema 5B, para a confirmação da presença dos insertos de interesse nos vetores de expressão. As colônias que continham o fragmento foram expandidas para purificação dos plasmídeos em pequena escala. Estas purificações foram feitas com o auxílio do “Kit” FastPlasmid™ (Eppendorff). A manutenção da fase aberta de leitura e a seqüência dos insertos foram confirmadas através de sequenciamento automático, com o uso do “kit” “BigDye” (Applied Biosystems).

4.4 Expressão e purificação do domínio citoplasmático de semaforina 5B em sistema heterólogo

Selecionados os vetores com as construções corretas, esses foram então utilizados para transformação de cepas de *E. coli* BL21 (DE3) quimiocompetentes para posterior expressão das proteínas recombinantes. Como será visto nos resultados, apenas a construção pET28a-CITO apresentou a seqüência correta. Assim, as etapas de expressão e purificação de proteína recombinante foram realizadas somente para His₆-CITO.

4.4.1 Transformação em *E. coli* BL21 (DE3) quimiocompetentes

Aproximadamente 50ng do plasmídeo purificado pET28a-CITO foram colocados no fundo de um tubo estéril e 100 μ l da suspensão de bactérias quimiocompetentes foram colocadas sobre o DNA. A mistura ficou em repouso em gelo por 30 minutos e logo a seguir prosseguiu-se com o processo do choque térmico. Os tubos foram incubados a 42°C por exatamente 90 segundos e logo em seguida recolocados no gelo por mais 2 minutos. Passado esse tempo, acrescentou-se ao conteúdo do tubo 900 μ l de meio SOC (triptona 20g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 1M, KCl 0,25M, MgSO₄ 2M e glucose 1M). Os tubos foram então incubados a 37°C sob agitação constante em baixa rotação por quarenta e cinco minutos. As suspensões então foram centrifugadas a 5000xg para sedimentação

das células e o sedimento foi ressuspenso para plaqueamento em LB-agar, contendo 50µg/ml de kanamicina. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Algumas das colônias obtidas foram utilizadas para averiguar a expressão de ϵ His-CITO, através do protocolo de expressão em pequena escala, como descrito a seguir.

4.4.2 Expressão de ϵ His-CITO em pequena escala (Mini-Expressão)

Algumas colônias obtidas após transformação da construção pET28a-CITO foram isoladamente expandidas em 2ml de meio LB contendo 50µg/ml de kanamicina, durante 16 horas a 37 °C. Estas culturas saturadas foram diluídas 1:50 em 10 ml de meio LB/Kana e foram crescidas a 37° C sob agitação constante. Ao atingir a absorbância a 600 nm de 0,6, foi adicionado IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo) na concentração final de 0,8mM para a indução da expressão da proteína recombinante. Essa indução ocorreu a 37°C, sob agitação. Alíquotas de 1,5ml da suspensão foram coletadas em três tempos de indução: 0h, 1,5h e 3h. As bactérias (1,5 ml da suspensão) foram sedimentadas por centrifugação a 4000 x g por 10 minutos a 4° C. O precipitado foi ressuspenso em 100µl de tampão de amostra redutor duas vezes (62 mM TrisHCl pH 6.8, 2% de SDS, 40% glicerol, 0,2% azul de bromofenol e 200 mM β -Mercaptoetanol), e 30µl foram submetidos a um SDS-PAGE 10%. Após a corrida, o gel foi corado com azul de Coomassie para visualização das proteínas dos extratos bacterianos e verificar quais clones apresentavam alta expressão do domínio de interesse. Uma colônia foi escolhida para a expressão em larga escala e purificação de ϵ His-CITO.

4.4.3 Expressão e purificação de 6His-CITO em larga escala

Uma das colônias de *E. coli* BL21 (DE3) contendo pET28a-CITO escolhida após ensaio de mini-expressão foi cultivada em 10 ml de meio LB contendo 50µg/ml de kanamicina, durante 16 horas a 37 °C. Esta cultura saturada foi diluída 1:50 em 1L LB/Kana e foram crescidas a 37° C sob agitação constante. Ao atingir a

absorbância de 0,6 a 600 nm, foi adicionado IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosideo) na concentração final de 0,8mM para a indução da expressão da proteína recombinante. Então, a cultura foi agitada a 30°C por mais três horas. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 4000 x g por 10 minutos a 4° C. O precipitado foi utilizado no processo de purificação. Primeiro tentou-se realizar uma purificação em condições nativas. Brevemente, o precipitado de bactérias obtido após indução, foi ressuspenso em 30ml de tampão de lise nativa (500mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH8,0 e 5 mM de Imidazol) e submetido à lise mecânica na prensa de French, após aplicação de alta pressão (16.000 psi). O extrato bacteriano obtido foi clareado por centrifugação (12000xg por 20 minutos, a 4°C) e o sobrenadante resultante foi incubado com 2mL da resina NTA-Ni-Agarose (Qiagen GmbH, Alemanha), previamente equilibrada no tampão de lise nativa. Essa incubação ocorreu durante 16 h, a 4°C, em um tubo, sob rotação. A resina foi transferida a uma coluna e lavada com 20 ml de tampão de lavagem, contendo 10 mM de imidazol, para que proteínas fracamente ligadas, por possuírem histidinas seqüenciais, se desligassem da coluna e diminuíssem a contaminação da proteína de interesse. Após as lavagens, tentou-se eluir a proteína recombinante com 500mM de imidazol. Todas as etapas da purificação foram monitoradas através de SDS-PAGE 15% (LAEMMLI, 1970), corado com azul de Coomassie. Como foi verificado que ϵ His-CITO apresentou-se insolúvel após a expressão, foi necessário realizar o procedimento de purificação em condições desnaturantes. Assim, precipitado de bactérias após indução foi ressuspenso em 30 mL de solução de lise desnaturante (6M uréia, 500 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 8.0 e 5 mM de Imidazol) e submetido à lise mecânica em prensa de French. O extrato bacteriano obtido foi clareado por centrifugação (12000xg por 20 minutos 4°C) e a parte solúvel deste clareado foi então submetida à cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). As proteínas contendo a etiqueta de 6 histidinas ligaram à fase estacionária NTA-Ni-Agarose (Qiagen GmbH, Alemanha) através de ligação de coordenação do cátion Ni^{2+} imobilizado e das histidinas presentes na quimera protéica ϵ His-CITO. A resina foi transferida a uma coluna e lavada com tampão de lise desnaturante contendo 80 mM de imidazol. A coluna de resina com a proteína de interesse também passou por um gradiente de uréia de 6M para 0M (30ml totais) para retirada de toda uréia e renaturação gradual da proteína. Fez-se nova lavagem utilizando tampão fosfato (50mM NaH_2PO_4 pH8 e 300mM NaCl). As proteínas ligadas à resina

foram utilizadas nos ensaios de pull-down. Amostras das várias etapas da purificação foram verificadas em SDS-PAGE 15%, corado com azul de Coomassie.

4.5 Ensaio de “*Western blotting*” utilizando anticorpo anti His-tag

A mini-expressão de His6-CITO e as etapas de purificação em larga escala desse domínio recombinante foram também analisadas através da técnica de “Western Blotting” com o anticorpo anti-₅His (Invitrogen Co.). Brevemente, as proteínas foram resolvidas por separação eletroforética em SDS-PAGE 15% e transferidas e imobilizadas à membrana de nitrocelulose. Após coloração da membrana com Ponceau-S para avaliação da eficiência da transferência, a membrana foi bloqueada em temperatura ambiente, durante 1 h com TBST (120 mM NaCl; 20 mM Tris; 0.05% de Tween 20), contendo 5 % de leite desnatado e posteriormente incubada com anticorpo monoclonal anti-₅His, diluído em solução de bloqueio (diluição 1:4000) durante à noite, à 4º C. Lavou-se a membrana 5 vezes (5 min cada lavagem) com TBST. A membrana foi então incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo acoplado a HRP – “Horseradish peroxidase” (Santa Cruz) diluído em tampão de bloqueio (diluição 1:300), durante 1 hora, a temperatura ambiente. Nova série de 5 lavagens com TBST foi realizada, prosseguindo a revelação da membrana com substrato adequado para reação quimioluminescente (Amersham – Pharmacia). Um filme radiográfico (Kodak) foi exposto à membrana até obtenção do sinal adequado.

4.6 Ensaio de pull-down usando ₆His-CITO imobilizada em resina de Ni-NTA-Agarose

4.6.1 Preparo dos extratos de cérebros de camundongos

Encéfalos de camundongos adulto e embriões (E11) após serem removidos e lavados rapidamente com PBS gelado, foram homogeneizados em tampão de lise (PBS 1X, pH 7,4, 1% de Triton X-100 e 1% de NP40, 1mM de PMSF) em tubo Dalce

com pistilo de teflon, em ciclos de 30 segundos, seguido de repouso em gelo por 40 minutos. O homogenato foi centrifugado a 10.000rpm por 30 minutos em centrífuga Beckman J-21B rotor JA 20. Após aliquotar as amostras, realizou-se reação de Bradford para determinação da concentração de proteínas. As amostras foram armazenadas a -20 °C para posterior utilização nos ensaios de “pull down”)

4.6.2 Ensaio de pull-down

Os extrato de cérebro de camundongo adulto e E11 obtidos (1,2 mg totais de cada) foram diluídos 1:1 em PBS 1X (volume final de 800 µl) e então centrifugados a 5000xg durante 15 minutos a 4° C. Os extratos foram incubados com 80µl da resina Ni-NTA-Agarose, previamente equilibrada com o mesmo tampão dos extratos, durante 2h, a 4° C. Esse procedimento foi realizado para retirada de interações inespecíficas. Após centrifugação de 2.000 xg, por 2 minutos, recuperou-se o sobrenadante. Metade deste foi incubado com a proteína 6His-CITO ligada a matriz de Ni-NTA-Agarose (60 µl) durante 2h a 4° C e a outra metade foi incubada com o mesmo volume da resina vazia, nas mesmas condições. Em seguida, as resinas foram lavadas 7 vezes com 1ml do tampão de lise (sem inibidores). O material que permaneceu ligado foi eluído com 30 µl de tampão redutor para SDS-PAGE 2,5x concentrado, fervido a 100°C durante dez minutos e submetido a 10% SDS-PAGE e analisado.

O mesmo procedimento foi repetido para que fosse possível efetuar a análise do material obtido por SDS-PAGE 2D e espectrometria de massa (MALDI TOF).

4.7 Eletroforese Bidimensional, Espectrometria de Massa (MALDI-TOF) e Identificação das Proteínas por PMF (“Peptide Mass Fingerprinting”)

Após ensaio de pull-down, as proteínas eluídas com o tampão de reidratação (6M de uréia, 2M de tiuréia, 50mM DTT, 1% CHAPS, 0,5% tampão IPG pH 3-10 linear) foram utilizadas para realização de focalização isoeletrica (IEF) das amostras. Nesta etapa as proteínas foram separadas com base em seus pontos isoeletricos (1ª

dimensão). A isoeletrofocalização das amostras foi realizada em equipamento IPGphor II (GE Healthcare) utilizando tiras de IPG (IPG Dry Strips de 13cm – Amersham Biosciences) com faixa de pH de 3 a 10 não linear.

Após isoeletrofocalização as tiras foram equilibradas em tampão de equilíbrio (50mM Tris-HCl pH 8.8, uréia 6M, tiuréia 2M, glicerol 30%, 2% SDS e traços de azul de bromofenol) acrescido de 50mM DTT (agente redutor) por 30 minutos. Em seguida as tiras foram incubadas por mais 30 minutos com tampão de equilíbrio acrescido de 4,5% de iodoacetamida (responsável por alquilar grupos tiol prevenindo reoxidações durante a eletroforese). Finalmente as tiras foram lavadas por alguns segundos em tampão de corrida (25mM Tris-base, 192mM glicina e 0,1% SDS) sendo, então aplicadas sobre gel SDS-PAGE 10% (segunda dimensão). Foi utilizada cuba tipo Hoefer SE 600 Ruby (GE Healthcare) com tampão de corrida mantido a 15°C.

Os géis foram corados com prata de acordo com protocolo do “kit Silver Staining” (Amersham Biosciences), coloração que é compatível com espectrometria de massa. Após digitalização das imagens dos géis, os “spots” obtidos foram retirados manualmente (com a ajuda de um bisturi), identificados e transferidos para tubos de 500µL, onde foram descorados. Nesta etapa, os “spots” foram incubados por 5 minutos sob agitação em 30mM $K_3Fe(CN)_6$ e 100mM $Na_2S_2O_3$ e em seguida lavados 4 vezes de 15 minutos sob agitação com água ultrapura, para então serem incubados com 200mM bicarbonato de amônio por 20 minutos. Por fim, os “spots” foram lavados novamente com água ultrapura. Finalmente foram desidratados com 100µL de acetonitrila 100% e secos em concentrador rotatório à vácuo (“Speed-vac”) por 20 minutos. Após esta etapa os “spots” podem ser armazenados a -20°C por tempo indeterminado ou usados para a digestão triptica.

Para a digestão *in gel* dos spots selecionados, foi utilizado 10ng/µL de tripsina (“Sequencing Grade Modified Trypsin” - Promega) em tampão contendo 40mM NH_4HCO_3 e 10% acetonitrila. A digestão foi feita por 16 horas a 37° C e os fragmentos da digestão triptica foram extraídos por sonicação, com tampão de extração (5% ácido trifluoroacético (TFA) e 50% acetonitrila). Foram feitas três extrações para cada “spot”, recuperadas em novos tubos de 500µL, secas em “Speed-vac” por 2 horas, e os peptídeos ressuspensos em 10µL de 0,1% TFA. Os

peptídeos foram então concentrados com o uso de ponteiras com resina cromatográfica C18 fixada na ponta da ponteira de acordo com o fabricante (“Perfect Pure C-18 Tips” – Eppendorf). Nesta etapa foi feita a mistura dos peptídeos com a matriz (ácido α -ciano-hidroxicinamínico) para espectrometria de massa na proporção 1:1 e as amostras foram aplicadas em placa para MALDI (scout MTP MALDI íon source 384 target - Bruker Daltonics, GmbH).

A análise de espectrometria de massa foi realizada em equipamento Ultraflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, USA). Foram utilizados para identificação positiva das proteínas os valores de massa triptica obtidos pelas análises espectrométricas.

As proteínas foram identificadas por PMF (“peptide mass fingerprinting”) com o auxílio do programa MASCOT (Matrix Science, UK) e do banco de dados SWISS-PROT. Foi tolerada uma perda de clivagem por peptídeo, com tolerância de massa de 100 a 200ppm. Modificações variáveis tais como carbamidometilação de cisteínas e oxidações de metioninas foram consideradas na busca.

5 RESULTADOS

5.1 Construções dos vetores para a expressão dos domínios da Semaforina 5B

Com o intuito de expressar domínios distintos de semaforina 5B em sistema heterólogo (*E. coli*), primeiramente amplificou-se por reação de PCR partes do cDNA codificante para semaforina 5B. Assim, foram realizadas reações de PCR com oligonucleotídeos específicos para os fragmentos correspondentes aos domínios SEMA+PSI (parte da porção extracelular da proteína semaforina 5B) e CITO (porção citoplasmática da semaforina 5B). Para averiguar a amplificação dos fragmentos de interesse a partir do cDNA de cérebro de camundongos, submeteu-se o produto da reação de PCR, à eletroforese em gel de agarose 0,8% e posterior coloração com brometo de etídeo (figura 1, 2, e 3).

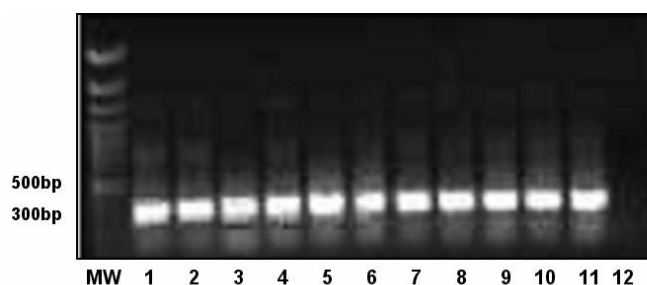


Figura 1 - PCR do domínio CITO: o domínio CITO da semaforina 5B (~300bp) foi amplificado por reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos. Gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídeo mostra produto de PCR no tamanho esperado. MW: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas); lanes 1 a 11: produtos de PCR; lane 12: controle negativo.

Para o domínio CITO as condições estabelecidas para a reação de PCR foram eficientes resultando na amplificação do fragmento no tamanho esperado para domínio CITO (284 bp) (Figura 1). Já para o domínio SEMA+PSI, as condições comumente usadas não foram eficientes e foi necessário fazer a padronização da reação de PCR para a amplificação desse domínio (Figura 2). Algumas modificações foram realizadas na reação, como adição de DMSO e alteração da concentração dos iniciadores. Como pode ser visto na figura 2 a utilização 5% de DMSO foi eficiente

em amplificar o domínio desejado. Sabe-se que o DMSO pode auxiliar na reação evitando a formação de conformações secundárias no DNA molde e nos oligonucleotídeos, permitindo assim um melhor pareamento entre essas moléculas.

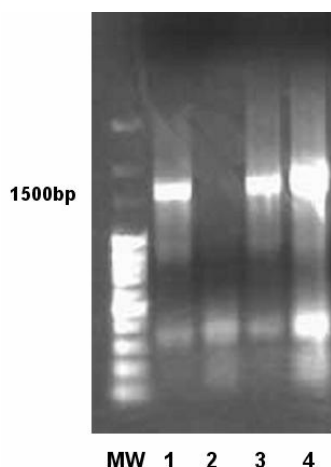


Figura 2 – Padronização da amplificação do domínio SEMA+PSI com DMSO: o domínio SEMA+PSI da semaforina 5B (~1500bp) foi amplificado por reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos em diferentes concentrações e 5% de DMSO. Gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio mostra produto de PCR no tamanho esperado. MW: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas); lanes 1 a 4 produtos de PCR sendo que: lane 1 usou-se 0,1 μ M de iniciadores, lane 2, 0,5 μ M de iniciadores, lane 3, 0,1 μ M de iniciadores e 5% de DMSO, lane 4, 0,5 μ M de iniciadores e 5% de DMSO.

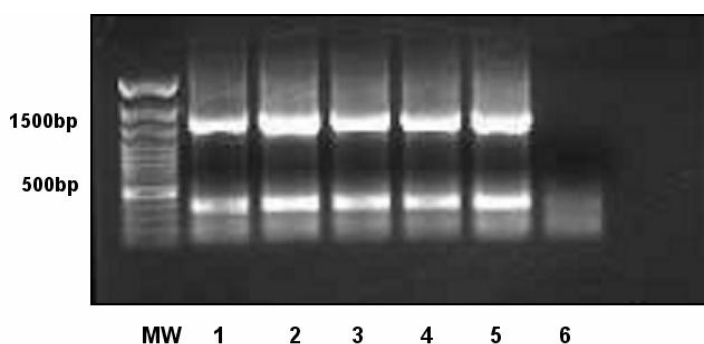


Figura 3 - PCR do domínio SEMA+PSI padronizado com DMSO: o domínio SEMA+PSI da semaforina 5B (~1500bp) foi amplificado por reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos e 5% de DMSO. Gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio mostra produto de PCR no tamanho esperado. MW: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas); lanes 1 a 5: produtos de PCR; lane 6: controle negativo.

A figura 3 mostra que dois fragmentos foram obtidos após essa reação. Um deles possui o tamanho esperado (1516 bp), sugerindo que essa banda corresponda ao domínio SEMA + PSI. Deve-se notar também a presença de uma banda mais baixa, na altura de 400 pb. Tanto para o domínio CITO (figura 1), como para o domínio SEMA+PSI (figura 3), várias reações de PCR foram realizadas (cerca de 10 reações de 25 µl) para que quantidades suficientes destes fragmentos pudessem ser purificadas e utilizadas nas próximas etapas de clonagem. Os fragmentos amplificados foram então purificados do gel de agarose e digeridos com as enzimas de restrição necessárias para serem inseridos nos vetores de expressão pET28a e pGEX2T. Essa estratégia da gel-purificação foi válida principalmente para os produtos de PCR para SEMA+PSI, já que uma banda a mais, com peso molecular menor que o esperado (de 400bp) também foi amplificada. Assim, com a gel-extração, somente a banda desejada (de 1516 bp) foi retirada, purificada e utilizada nas etapas seguintes.

Os fragmentos CITO e SEMA+PSI após digestão, foram novamente submetidos a um gel de agarose 0,8% para nova purificação. Então eles foram quantificados e usados em reações de ligação com os vetores de expressão pET28a e pGEX2T, previamente digeridos nos mesmos sítios de restrição e desfosforilados nas extremidades 5'. Os produtos de ligação foram concentrados por precipitação com etanol e acetato de sódio e usados para transformação de bactérias eletrocompetentes da estirpe DH5α de *E. coli*. Reações de ligação controles também foram realizadas. Nestas, todos os reagentes foram adicionados, com exceção dos respectivos insertos. Assim, a taxa de re-ligação dos plasmídeos poderia ser monitorada. Várias colônias foram obtidas, entretanto houve a necessidade de se confirmar a presença dos insertos nelas, já que as reações de ligação controle também geraram colônias após transformação. Para essa confirmação procedeu-se PCR de colônia com iniciadores para os insertos e as próprias colônias obtidas foram usadas como moldes.

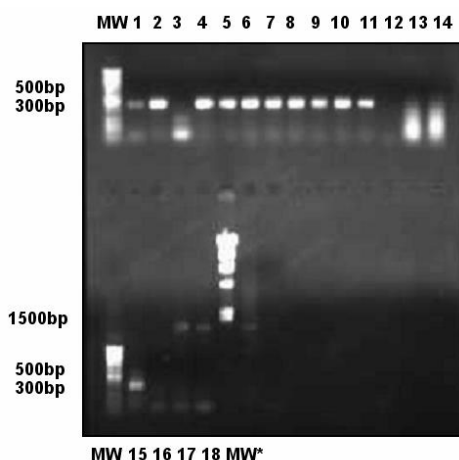


Figura 4 – PCR de colônia para confirmar presença e orientação do inserto: clones transformados com as construções pET28a-CITO, pET28a-SEMA+PSI e pGEX2T-CITO foram submetidos a uma reação de PCR de colônia utilizando oligonucleotídeos específicos para regiões dos insertos e dos plasmídeos. Gel agarose (0,8%): MW GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas); lane 1 a 11 clones com a construção pET28a-CITO; lane 12 controle negativo, lane 13 a 15 clones com a construção pGEX2T-CITO; lane 16 controle negativo; lane 17 e 18 clones com a construção pET28a-SEMA+PSI; MW* Lambda DNA/HindIII Marker,(Fermentas).

Como pode ser visto na figura 4, algumas colônias das ligações pET28a-CITO, pGEX2T-CITO e pET28a-SEMA+PSI tiveram o inserto amplificado. A transformação com a construção pGEX2T-SEMA+PSI não gerou colônias. Escolheu-se então clones positivos de cada construção para confirmação das seqüências através de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxinucleotídeos. A tabela I apresenta o resumo da análise das seqüências obtidas dos insertos clonados, após alinhamento com a seqüência do cDNA da Semaforina 5B retirada do banco de dados (ref. NM_013661.1) através do programa CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw>). Através do programa ORF Finder, disponível na página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>, foi possível verificar se as seqüências estavam em fase e alinhar comparar as seqüências de aminoácidos (as do inserto X esperada) também através do programa CLUSTAL W. A tabela I mostra que as duas construções (clones 1 e 2) contendo a seqüência codificadora para o domínio SEMA+PSI no vetor pET28a continham muitos erros: várias trocas de nucleotídeos ocorreram e deleção de pelo menos um nucleotídeo também foi observada. Essa última modificação alterou a fase aberta de leitura do domínio em questão. Já as construções contendo a seqüência codificadora para o

domínio CITO estavam na correta fase de leitura. A construção pGEX2T-CITO apresentou troca de um único nucleotídeo, o que gerou uma alteração de aminoácidos (E por K). A construção pET28a-CITO apresentou a seqüência correta. Devido a esses resultados, a construção pET28a – CITO foi a escolhida para dar continuidade ao trabalho.

Tabela I: Resultado do seqüenciamento dos clone obtidos

Construções	Clones	Resultado dos sequenciamentos	Alterações
pET28a-Sema+PSI	1	-manutenção dos sítios de restrição -várias mutações de ponto; - perda de 1 nt	-troca de aminoácidos -mudança da fase aberta de leitura
	2	Idem clone 1	Idem clone 1
pET28a-CITO	1	-manutenção dos sítios de restrição -seqüência de nt correta e fase aberta de leitura preservada	-nenhuma alteração
pGEX2T-CITO	1	-manutenção dos sítios de restrição -fase aberta de leitura preservada -alteração de 1 nt (G para T)	-alteração de um aminoácido (E para K)

5.2 Expressão e purificação das construções da proteína Semaforina 5B

A construção CITO-pET28a foi transformada em bactérias quimiocompetentes da estirpe BL21(DE3) de *E. coli* para a expressão do domínio recombinante de interesse. Três das colônias obtidas foram testadas em ensaios de mini-expressão para verificar a efetiva expressão da proteína recombinante ϵ His-CITO. Amostras não induzidas e induzidas com IPTG durante 1,5 h e 3 h foram submetidas à SDS-PAGE 15%. Após coloração do gel com azul de Coomassie (figura 5A), pode-se perceber o aumento de intensidade de uma banda na altura de 11kDa nas amostras induzidas por 3h (flechas). Esse peso molecular corresponde ao que é esperado para ϵ His-CITO. Para confirmar que essa banda era mesmo o domínio recombinante, realizou-se um ensaio de “Western blotting”, utilizando anticorpo contra etiqueta de cinco histidinas, anti- ϵ His (Invitrogen Co.), que revelou a presença da proteína recombinante nas amostras induzidas por 3h (figura 5B).

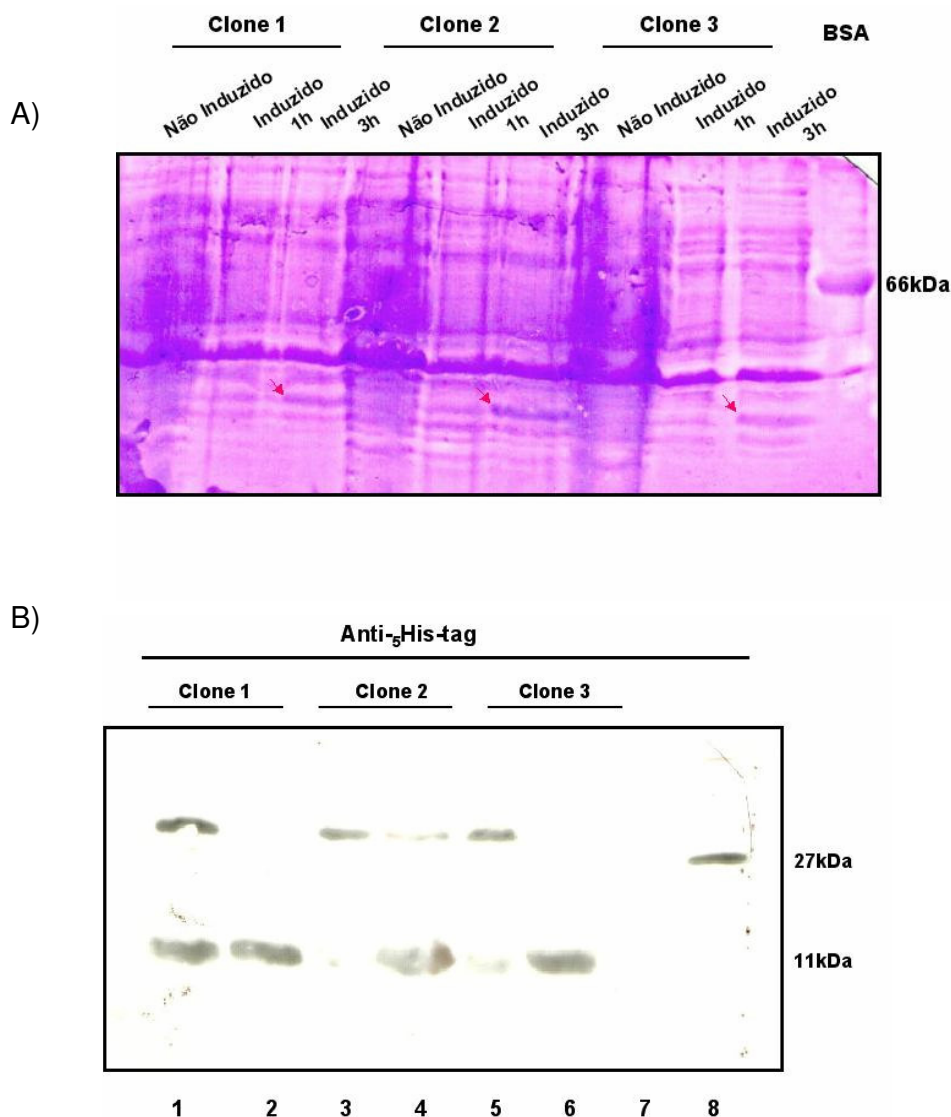


Figura 5 – Mini expressão da proteína recombinante His6CITO em sistema heterólogo em *E.coli* : o plasmídeo pET28a-CITO foi transformado em células competentes de *E. coli* BL21 (DE3). Três diferentes colônias de bactéria foram crescidas em meio LB contendo kanamicina (50 μ g/ml), até alcançar a $A_{600nm} = 0,6$ a 37°C. então a expressão de proteína foi induzida com 0,8mM IPTG por 1 hora e 3 horas a 30°C. Os extratos das bactérias foram ressuspensos em tampão de amostra contendo 2-mercaptoetanol, resolvidos por SDS-PAGE 15% e corados com azul de Coomassie (A). O peso molecular esperado para His6-Cito é ~11kDa e foi expresso em todas as colônias (flechas). Depois de resolvido por SDS-PAGE (15%), as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose. A análise por “Western blotting” mostrou que todos os clones produziram a proteína recombinante (B). Lanes 1, 3 e 5 1h induzidos, lanes 2, 4 e 6 3 h induzidos; lane 7 controle negativo e lane 8 controle positivo. A proteína recombinante foi detectada por anticorpo monoclonal anti-5His direto contra a cauda de 6His. Como controle positivo foi utilizada a proteína His6PrPc.

Sabendo-se que os clones testados expressavam a proteína de interesse, tomou-se um deles para fazer a expressão e purificação em larga escala de δ His-CITO. Primeiramente, foi feita uma tentativa de purificação do domínio recombinante em condições nativas. Assim, após crescimento e indução com IPTG (indução feita durante 3h, condição estabelecida no ensaio de mini-expressão), a suspensão de bactérias foi sedimentada e ressuspensa em tampão de lise nativo e então se procedeu a lise mecânica das células utilizando a prensa de French. Após centrifugação para retirada de células não lisadas e partículas insolúveis (clarificação), incubou-se o sobrenadante resultante com a resina Ni-NTA-agarose para purificação de δ His-CITO (ver detalhes da purificação em “Materiais e Métodos”). Em cada etapa da expressão e da purificação, alíquotas foram coletadas para verificar a presença do domínio recombinante. Essas alíquotas foram submetidas a um SDS-PAGE 15% para coloração com azul de Coomassie (figura 6A) e também para análise em “Western blotting” com anticorpo anti- δ His (Invitrogen Co.) (figura 6B). A figura 6 indica que a maior parte da proteína recombinante apresentou-se na fração insolúvel após lise em condições nativas e, portanto não foi observada nas etapas de purificação (resina, lavagens e eluatos). Esse resultado sugeriu que δ His-CITO estava presente nos corpos de inclusão das bactérias.

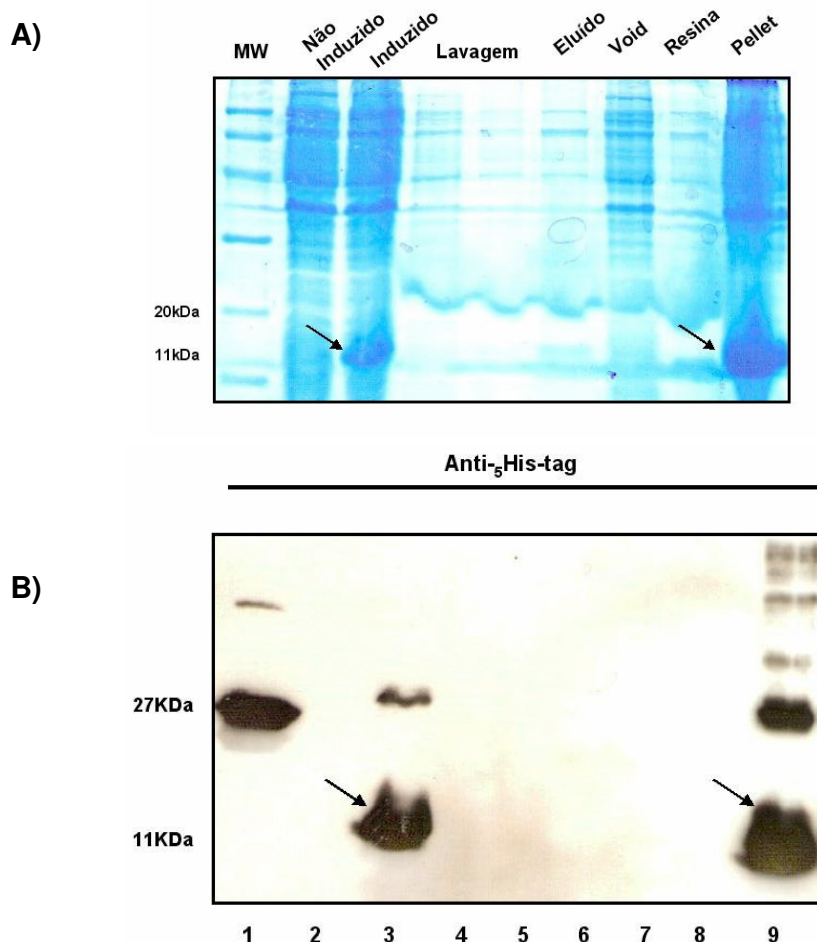
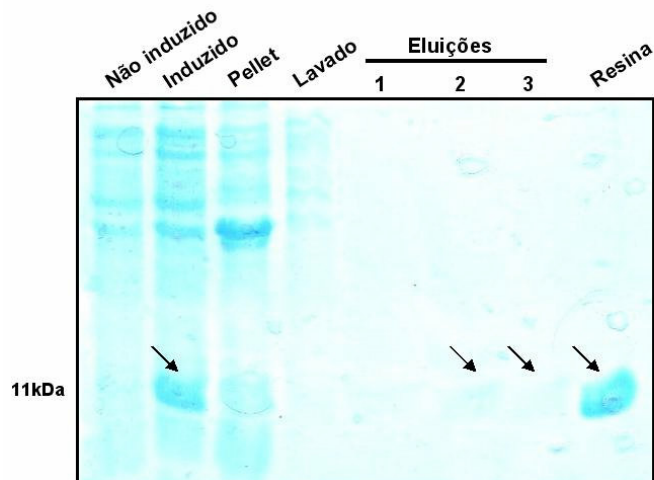


Figura 6 A - Purificação da proteína recombinante 6HisCITO em condições nativas:

Após a expressão, as bactérias foram lisadas por método físico (french press) e químico (tampão de lise nativa). O lisado contendo His6CITO foi incubado com resina Ni-NTA-Agarose para a purificação da proteína recombinante. A 6HisCITO foi eluída por competição com imidazol. As amostras de cada passo da purificação foram misturadas com tampão de amostra contendo 2- mercaptoetanol, resolvidas por SDS-PAGE (15%) e coradas com azul de Coomassie. (A) MM marcador molecular para proteína Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas), 1 – não induzido, 2 – induzido, 3 4 e 5 – lavados, 6 – void, 7 – resina e 8 – pellet. As setas indicam onde ficou concentrada a proteína recombinante 6HisCITO. Western blotting da purificação da proteína recombinante 6HisCITO em condições nativas (B): após resolução por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para membrana de nitrocelulose. A análise de western blotting com anticorpo anti-5His diretamente contra cauda de 6His da proteína recombinante mostrou que a 6HisCITO estava concentrada no precipitado, após expressão. Como controle positivo (C+) foi usada a proteína His6PrPc. 1 – extrato de bactéria não induzido, 2 – extrato de bactéria induzido, 3 4 e 5 – lavagens, 6 – o que não se ligou à resina, 7 – o que se ligou à resina, 8 – precipitado após lise e centrifugação do extrato bacteriano.

Assim decidiu-se realizar a purificação do domínio recombinante em condições desnaturantes, condições estas que poderiam favorecer a solubilização de ϵ His-CITO e que não deveriam interferir no sistema de purificação. Para isso, a lise bacteriana foi feita em tampão desnaturante (contendo 6M de uréia), além da lise mecânica realizada na prensa de French. O extrato resultante, após a lise e clarificação, foi incubado com NTA-Ni-Agarose (Qiagen GmbH, Alemanha) para que a proteína portadora da cauda de seis histidinas ficasse imobilizada na resina. Então, foi realizado um processo de renaturação da proteína imobilizada na coluna de NTA-Ni-Agarose. Neste processo, o agente desnaturante é removido lentamente a partir da geração de um gradiente de linear, partindo de maior concentração para menor concentração do agente desnaturante. Neste caso, a faixa de gradiente empregado foi de 6M a 0M de uréia. A eluição da proteína recombinante foi realizada com a adição de uma solução contendo 500 mM de imidazol, reagente que compete com a cauda de seis histidinas pela coordenação do Ni^{+2} da resina. Amostras de cada etapa da purificação em condições desnaturantes foram removidas para análise em SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie (figura 7A) e em “Western blotting” empregando um anticorpo que reconhece uma etiqueta de cinco histidinas, anti- ϵ His (Invitrogen Co.) (figura 7B). Como pode ser visto na figura 7, uma pequena parte do domínio recombinante ainda permaneceu insolúvel (linha 4, fig. 7B), mas uma quantidade significativa ficou solúvel e pode ser purificada e eluída (linhas 6 e 7 da figura 7A e linhas 8 e 9 da fig. 7B). As condições utilizadas não foram eficientes em remover toda a proteína purificada da resina, já que boa parte permaneceu ligada à mesma (linha 8, fig. 7A e linha 5, fig. 7B). Para os objetivos do presente trabalho foi útil utilizar ϵ His-CITO ligado à resina, sobretudo nos ensaios de “pull down”, como será visto a seguir.

A)



B)

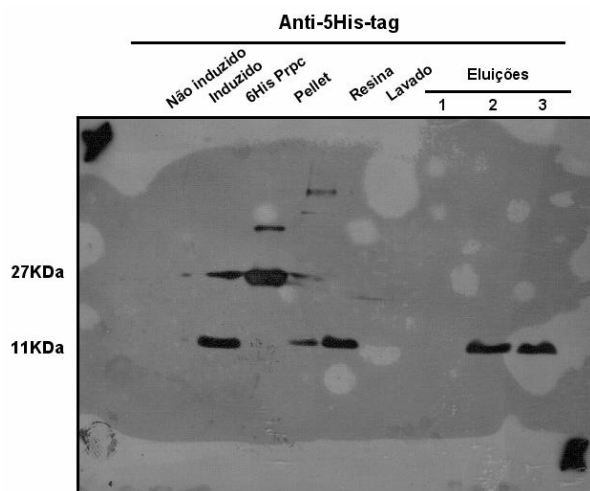


Figura 7 - Purificação da proteína recombinante 6HisCITO em condições desnaturantes: Após a expressão, as bactérias foram lisadas por método físico (french press) e químico (tampão de lise desnaturante). O lisado contendo His6CITO foi incubado com resina Ni-NTA-Agarose para a purificação da proteína recombinante. A 6HisCITO foi eluída por competição com imidazol. As amostras de cada passo da purificação foram misturadas com tampão de amostra contendo 2- mercaptoetanol, resolvidas por SDS-PAGE (15%) e coradas com Coomassie-blue (A). 1 – não induzido, 2 – induzido, 3 pellet, 4 e 5 – lavados, 6 e 7 – eluídos, 8 – resina. As setas indicam onde ficou concentrada a proteína recombinante 6HisCITO. Western blotting da purificação da proteína recombinante 6HisCITO em condições desnaturantes (B) após resolução por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para membrana de nitrocelulose. A análise de western blotting com anticorpo anti-5His diretamente contra cauda de 6His da proteína recombinante mostrou que a 6HisCITO estava concentrada na resina da purificação. Como controle positivo (C+) foi usada a proteína His6PrPc. 1 – não induzido, 2 – induzido, 3 - His6PrPc, 4 – pellet, 5 – resina, 6 e 7 – lavados, 8 e 9 – eluídos.

5.3 Ensaios de “pull down” com a proteína recombinante ϵ His-CITO

A realização de ensaios de pull down com ϵ His-CITO teve como intuito isolar proteínas que poderiam interagir *in vitro* com o domínio citoplasmático da semaforina 5B. Deve-se lembrar que essa proteína é transmembrânica e, portanto, a identificação de interações intracelulares podem trazer informações úteis sobre sinalização realizada pelas semaforinas de classe 5.

Para verificar a interação *in vitro* da proteína recombinante ϵ His-CITO com outras proteínas presentes em cérebro de camundongo, foram utilizados extratos protéicos provenientes de cérebro de camundongo que foram incubados com a proteína recombinante ϵ His-CITO imobilizada à resina Ni-NTA-Agarose. Após muitas lavagens para retirada do material não ligado, o material que permaneceu ligado na resina foi analisado por SDS-PAGE 10% e corado com Coomassie coloidal (figura 8). Como controle negativo, realizou-se a incubação de mesma quantidade de extrato de cérebro de camundongo com a resina Ni-NTA-Agarose vazia, sem proteína recombinante imobilizada.

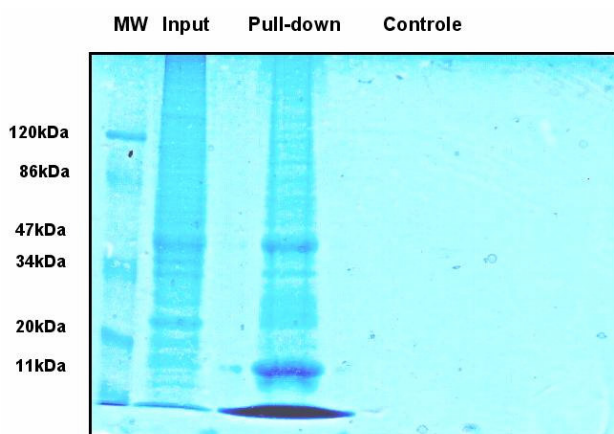


Figura 8: Ensaio de “pull-down”: SDS-PAGE 10%, corado com coomassie coloidal do ensaio. Lane 1 MW Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas), lane 2 Input: extrato de cérebro de camundongo, lane 3 “Pull-down”: extrato de cérebro de camundongo incubado com ϵ His-CITO presa à Ni NTA Agarose, lane 4 Controle negativo: extrato de cérebro de camundongo incubado com a Ni-Nta-Agarose vazia.

Como pode ser visto na figura 8, várias bandas presentes no extrato (“input”) ligaram-se à resina contendo ϵ His-CITO. A especificidade destas interações pode ser confirmada através da comparação com o ensaio controle. Como nenhuma banda se ligou à resina Ni-NTA-Agarose vazia, é possível concluir que os ligantes obtidos interagiram com o domínio recombinante ϵ His-CITO. É possível notar que uma banda forte de baixo peso molecular (cerca de 11 kDa) também está presente no ensaio de “pull-down”. A intensidade e a massa molecular dessa proteína indicam que ela deva corresponder à ϵ His-CITO.

Repetiu-se o mesmo ensaio de pull down comentado acima para que a análise fosse feita em eletroforese bi-dimensional, com a finalidade de se isolar as bandas dos possíveis ligantes da proteína recombinante ϵ His-CITO e tentar identificá-las por espectrometria de massa (MALDI-TOF). A figura 9 mostra os “spots” obtidos após resolução dos ligantes de ϵ His-CITO (após pull-down”) em eletroforese bi-dimensional e coloração por prata. Os “spots” mais fortes foram então removidos para digestão com tripsina e análise e identificação dos peptídeos em espectrometria de massa. A tabela II apresenta o resultado obtido após identificação de cada um dos “spots”. Entre as proteínas identificadas estão a beta-2A-tubulina, ATP sintase (subunidade beta) e actina citoplasmática 1 entre outras (Tabela II). Algumas dessas proteínas despertaram interesse porque são proteínas que fazem parte do citoesqueleto (ver Tabela III), o que faz sentido uma vez que o ensaio foi feito com uma proteína recombinante derivada de um domínio citoplasmático.

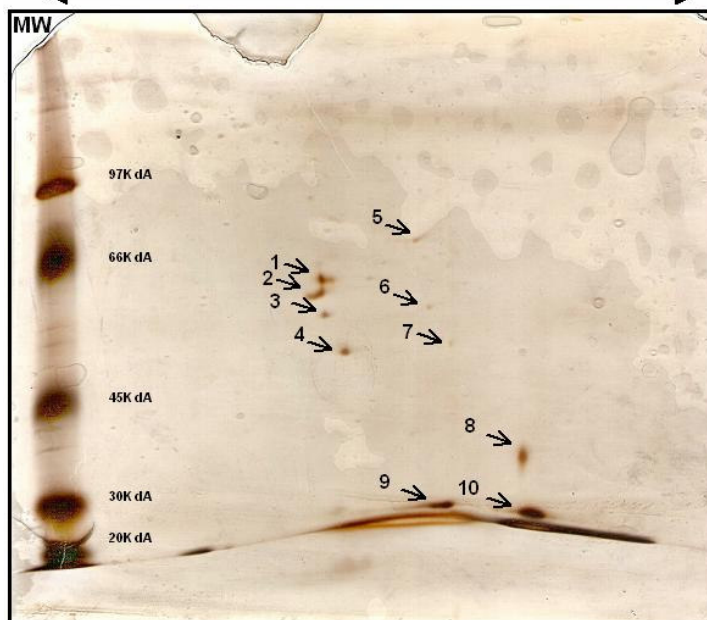


Figura 9: Ensaio de “pull-down” em gel bidimensional: Os ligantes obtidos no ensaio de “pull down”, após incubação de extrato de cérebro de camundongo com a proteína 6His-CITO ligada à Ni-NTA-Agarose, foram submetidos à eletroforese bidimensional e posterior coloração do gel por prata. As flechas indicam os spots que foram removidos para identificação dos peptídeos por espectrometria de massa.

Tabela II: Resultado da espectrometria de massa dos spots obtidos na eletroforese bidimensional

SPOT	PROTEÍNA	MASSA Da	pI	SCORE	SWISSPROT ACCESSION NUMBER	PEPTIDE MASS TOLERANCE
1	TBA1C_MOUSE Tubulin alpha-1C chain - Mus musculus (Mouse)	50562	4.96	34	P68373	200ppm
2	TBB2A_MOUSE Tubulin beta-2A chain - Mus musculus (Mouse).	50274	4.78	64	Q7TMM9	100ppm
3	ATPB_MOUSE, ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor - Mus musculus (Mouse)	56265	5.19	75	P56480	200ppm
4	ACTB_MOUSE, Actin, cytoplasmic 1 - Mus musculus (Mouse).	41710	5.29	63	P60710	300ppm
5	Massa insuficiente	-	-	-	-	-
6	Massa insuficiente	-	-	-	-	-
7	Massa insuficiente	-	-	-	-	-
8	SEM3B_MOUSE Semaphorin-3B precursor - Mus musculus (Mouse)	83982	9.07	16	Q62177	100ppm
9	LY49A_MOUSE, T-cell surface glycoprotein YE1/48 - Mus musculus (Mouse)	31276	8.67	37	P20937	200ppm
10	SEM3B_MOUSE Semaphorin-3B precursor - Mus musculus (Mouse)	83982	9.07	20	Q62177	100ppm

Tabela III: Funções das proteínas identificadas por espectrometria de massa

SPOTS	PROTEÍNAS	FUNÇÕES
1	TBA1C_MOUSE Tubulin alpha-1C chain	Maior constituinte de microtúbulos
2	TBB2A_MOUSE Tubulin beta-2A chain	Maior constituinte de microtúbulos
3	ATPB_MOUSE, ATP synthase subunit beta	Produção de ATP (subunidade catalítica)
4	ACTB(Beta-actin) e ACTG (Gamma-actin)_MOUSE, Actin, cytoplasmic 1	As isoformas de actina β e γ co-existem na maioria dos tipos celulares como componentes do citoesqueleto e são mediadoras da motilidade celular interna.
8 e 10	SEM3B_MOUSE Semaphorin-3B precursor	Inibe extensão axonal
9	LY49A_MOUSE, T-cell surface glycoprotein YE1/48	Receptor das células NK (natural killer) para alelos H-2d. Inibem atividade das células NK prevenindo lise celular

Outro interesse do trabalho foi o de comparar as interações realizadas com ϵ His-CITO em dois estágios diferentes do cérebro de camundongos: estágio adulto X estágio embrionário. Para isso, extratos protéicos provenientes de cérebros de camundongos adultos e extratos protéicos provenientes de camundongos E11 foram incubados separadamente com o domínio ϵ His-CITO imobilizado na resina. A análise dos ligantes destes ensaios de “pull-down” foi feita através de eletroforese bi-dimensional. A figura 10 mostra os géis corados com prata, obtidos após a segunda dimensão dos experimentos de “pull-down” com extrato de cérebro adulto (fig. 10A) e embrionário (fig. 10B). A comparação entre os vários “spots” obtidos não indica nenhuma diferença significativa entre os ligantes dos dois estágios do sistema nervoso central murino.

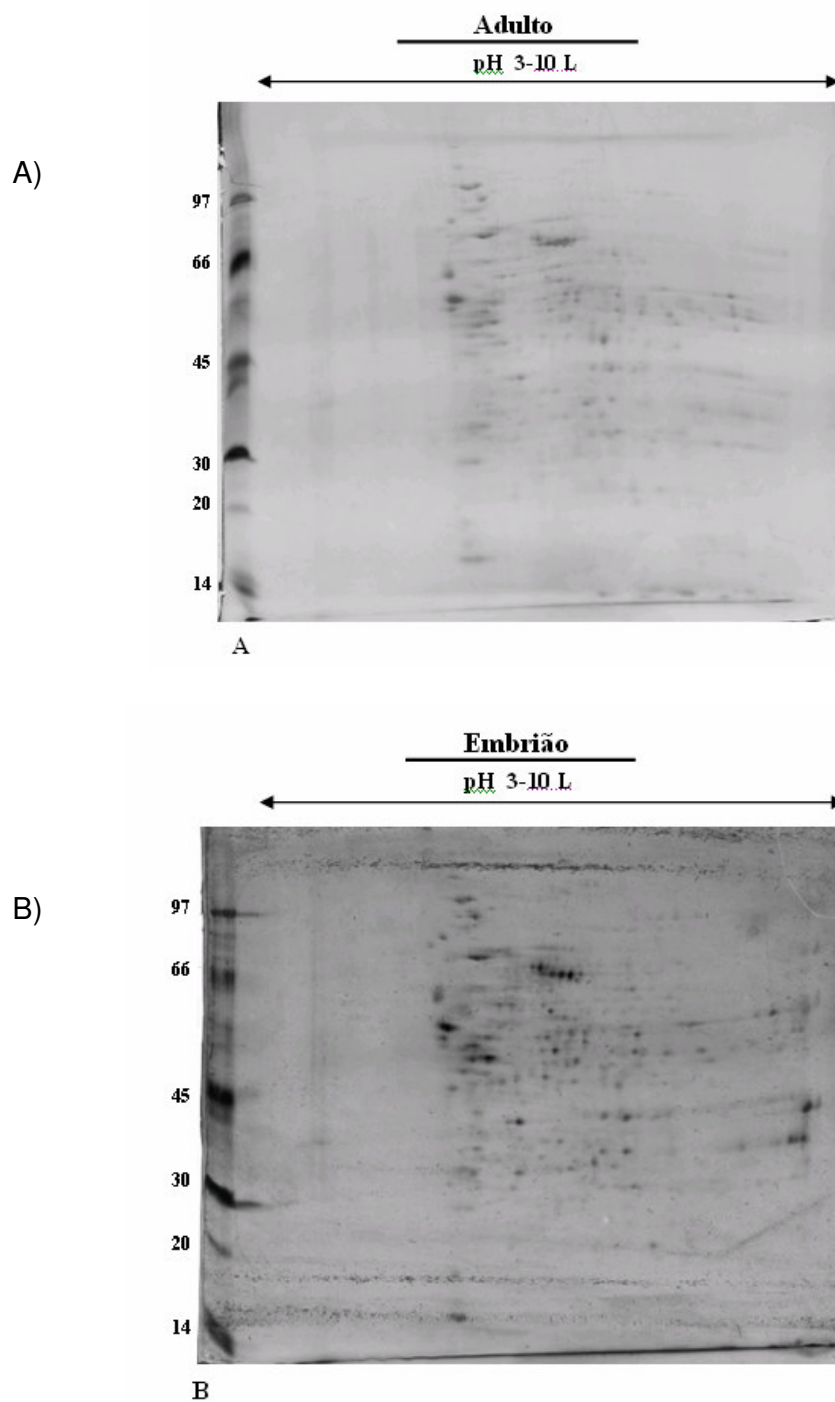


Figura 10 – Ensaio “pull-down” embrião e adulto: Eletroforese 2D de ensaios de pull-down **Adulto** (figura A) e **Embrião** (figura B). As proteínas eluídas da matriz de Ni-NTA agarose foram aplicadas em IPG DryStrip de 13cm (pH 3-10L) para IEF. Após etapa de equilíbrio com DDT e iodoacetamida as proteínas foram submetidas a SDS-PAGE (GEL 10%) a 15°C. Os géis foram corados com prata (Silver Stainig Kit - Amershan Biosciences).

6 DISCUSSÃO

A semaforina 5B é ainda uma proteína pouco estudada. O pouco que se sabe sobre ela nos permitiu traçar um rumo para esse trabalho. Um dos objetivos desse projeto foi o de produzir domínios recombinantes de Sema 5B em sistema heterólogo, ferramentas que poderão ser úteis em desvendar vários aspectos desta semaforina em particular, uma vez que ainda não existem ferramentas padronizadas para esta proteína ou disponíveis comercialmente. A semaforina 5B é constituída de uma região amino terminal extracelular contendo 485 resíduos de aminoácidos correspondente ao domínio Sema (também conhecido como Sema+PSI), uma região modular com 408 aminoácidos compondo 7 repetições de uma seqüência com alto grau de homologia às repetições encontradas em tromboespondinas 1 e 2 (TSP – *type 1 repeat*), um único domínio hidrofóbico transmembrânico e uma região citoplasmática carboxi terminal de 91 aminoácidos.

As repetições de TSP-1 constituem a região característica das semaforinas de classe 5 e têm sido implicadas na diferenciação, no crescimento de neuritos, no desenvolvimento do sistema nervoso central, nos processos de regeneração e na adesão neuronal (ADAMS & TUCKER, 2000). Tromboespondinas interagem com um grande número de proteínas e estão envolvidas em vários aspectos das interações entre células e matriz extracelular (ADAMS & TUCKER, 2000). Portanto, num primeiro momento a idéia deste trabalho era clonar o domínio com as sete repetições TSP de Sema 5B em vetores de expressão para produção dessa região em bactérias, porém isso talvez pudesse ser complicado, uma vez que a amplificação dessa seqüência por completo, usando iniciadores desenhados para esse domínio, poderia ser muito difícil devido ao grande número de repetições de seqüências de nucleotídeos nessa região.

Por isso optou-se por fazer um aprofundamento em outro aspecto interessante da semaforina 5B: o fato dela ser uma proteína integral de membrana sugere que ela pode estar envolvida tanto na sinalização extracelular como na intracelular. Nesse sentido, ficou decidido que iria-se trabalhar com os domínios SEMA+PSI (domínio extracelular de Sema5B) e CITO (domínio intracelular de Sema5B). Assim, foi iniciado o trabalho com as construções de vetores para a

expressão dos domínios de interesse. Foi conseguida a construção correta da sequência do domínio CITO em vetor pET28a e padronizada a expressão e a purificação de $_{6}\text{His-CITO}$. Este domínio recombinante ligado à Ni-NTA-Agarose foi então usado em ensaios de “pull-down” e ligantes provenientes de extratos de cérebros de camundongos puderam ser identificados. A seguir será feita a discussão detalhada dos resultados obtidos para cada uma das etapas do trabalho: 1) Construção dos vetores para expressão dos domínios recombinantes de Sema 5B; 2) Expressão e purificação de $_{6}\text{His-CITO}$; 3) Identificação de ligantes de $_{6}\text{His-CITO}$ (ensaios de “pull-down”).

1 Construção dos vetores para expressão dos domínios recombinantes de Sema 5B

Após obtenção do cDNA a partir do extrato de cérebro de camundongo, foram feitas as amplificações com os iniciadores específicos. Foram encontradas muitas dificuldades na obtenção do domínio SEMA+PSI. A primeira tentativa de amplificação desse domínio foi bem sucedida, porém as amplificações seguintes começaram a apresentar problemas. Foi necessário então a padronização dessa amplificação. Assim foram feitas reações de PCR com modificações, como alteração na concentração de iniciadores e a adição de DMSO na reação. Este último é capaz de auxiliar na reação por evitar a formação de conformação secundária no DNA. Como indica a Figura 2, a melhor condição para a amplificação desse fragmento foi utilizar concentração de $0,5\mu\text{M}$ pra os iniciadores e 5% de DMSO.

Outras hipóteses para explicar a dificuldade em amplificar o domínio SEMA+PSI podem estar relacionadas com o tamanho do fragmento e com a qualidade do cDNA obtido. Por ser um domínio de aproximadamente 1500bp, torna-se mais difícil a amplificação utilizando uma enzima como a Taq DNA Polimerase. Quanto ao cDNA obtido, é possível que poucas mensagens com a sequência completa de Sema5B tenha sido formada. A região que codifica para o domínio SEMA+PSI encontra-se na região 5' do mRNA e para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado oligonucleotídeo dT, que parecia na região 3' do mRNA. É mais difícil que a transcriptase reversa consiga fazer as fitas de cDNA que contenham a

seqüência codificadora inteira de Sema5B, ou seja, do poli A (extremidade 3') até o início do domínio SEMA+PSI (extremidade 5'). Dessa forma, poucos alvos seriam formados para que os iniciadores específicos para amplificar esta região em questão pudessem se ligar. Por outro lado, isso explica o grande sucesso para obter o domínio CITO uma vez que sua seqüência codificadora encontra-se mais próxima da extremidade 3' do mRNA. Outro fator que contribuiu para esse sucesso é o fato desse domínio ser pequeno (cerca de 300bp) e, portanto, mais fácil de ser amplificado por completo pela Taq DNA polimerase. Como foi visto nos resultados, foi possível padronizar as condições de PCR para amplificação dos dois fragmentos de interesse.

Após obter as seqüências de ambos os domínios, foi feita a inserção delas nos vetores de expressão escolhidos. Foram testados dois sistemas de expressão e purificação, pois somente de forma empírica é possível descobrir em qual sistema a proteína de interesse será obtida na forma solúvel, com sua conformação correta e em grandes quantidades. Assim os sistemas escolhidos foram os que utilizam os vetores pET28a e pGEX2T. O sistema de expressão baseado nos vetores pET facilita a purificação do produto de interesse através da inserção de uma etiqueta de 6 histidinas na proteína de interesse para a ligação à resina Ni-NTA-Agarose. Esse sistema permite que a proteína recombinante seja purificada tanto em condições nativas quanto desnaturantes.

Além disso, a etiqueta de 6 histidinas é bem menor do que muitas outras, sendo pouco imunogênica e parece não influenciar na conformação da molécula. Já o sistema de expressão baseado nos vetores pGEX oferece a possibilidade de se produzir e purificar uma proteína recombinante na sua forma solúvel, com a manutenção da sua conformação original, em fusão com a proteína GST. As proteínas recombinantes são purificadas através da passagem do lisado bacteriano por uma coluna de glutathione-Sepharose, seguida de eluição com glutathione reduzida livre.

Esses passos são todos feitos em condições não desnaturantes, o que é de grande importância para se manter tanto a conformação, quanto a atividade da proteína recombinante. Se houver necessidade, a proteína de interesse pode ser separada da GST através da clivagem por proteases específicas. Foram obtidas construções para o domínio CITO em ambos os vetores, porém para o domínio

SEMA+PSI, somente a construção no vetor pET28a foi conseguida. A construção desse domínio no vetor pGEX2T não foi obtida, mesmo após várias tentativas. Antes de utilizar as construções nos vetores de expressão, foi visto por meio do sequenciamento automático que algumas delas apresentavam erros (ver Tabela I).

Os motivos que levaram ao surgimento das mutações podem ser devido à introdução de erros pela própria enzima utilizada para a PCR – Taq polimerase – que pode inserir bases erradas, já que essa enzima não apresenta atividade de correção 3'-5' exonuclease. Sabe-se que a introdução de erros pode ocorrer em mais de 50% das moléculas de DNA produzidas após 25 ciclos de amplificação dirigida pela Taq de fragmentos maiores que 200bp (SAMBROOK & RUSSEL 2001). A construção pET28a-CITO foi a única que não apresentou alterações de sequência e por esse motivo foi escolhida para dar continuidade ao trabalho.

É importante mencionar que todo essa parte do trabalho, de Biologia Molecular, foi muito importante para o grupo, porque a partir dele padronizou-se muitos protocolos que estão sendo utilizados em outros projetos do Laboratório de Neurobiologia (Depto. Patologia Básica, UFPR).

2 Expressão e purificação de $_6$ His-CITO

A partir da construção pET28a-CITO foi iniciada a expressão e purificação da proteína recombinante $_6$ His-CITO, foram utilizados protocolos já estabelecidos para este tipo de sistema. Os experimentos de mini-expressão mostraram que $_6$ His-CITO foi expresso nas três colônias testadas, após 3 horas de indução com 0,8mM de IPTG (Figura 5). A colônia 3 foi então escolhida para a expressão e purificação em larga escala. Primeiro foi realizada a purificação em condições nativas. Entretanto, como pode ser visto nas figuras 6A e 6B, grande parte da proteína recombinante ficou precipitada após a lise. Assim foi necessária a purificação em condições desnaturantes. O protocolo de lise desnaturante emprega o uso de uréia como agente desnaturante. Essa condição não atrapalhou o andamento do trabalho porque o sistema baseado na cauda de 6 histidinas permite esse procedimento (desnaturação) sem que haja alterações no seu funcionamento. Porém, para obter a proteína na conformação adequada para que se pudessem realizar os ensaios

bioquímicos e funcionais foi necessário realizar a renaturação do domínio recombinante. Com a proteína imobilizada na coluna de Ni-NTA-Agarose, o agente desnaturante foi removido lentamente a partir da geração de um gradiente linear, partindo de maior concentração para menor concentração deste agente.

Como pode ser visto figura 7, o domínio recombinante $\text{{}_6\text{His-CITO}}$ pode ser purificado com sucesso. Entretanto, na fig 7B, o anticorpo anti-5His reconheceu bandas extras com peso molecular acima do esperado para o domínio de interesse. Como o peso das bandas parece equivaler a múltiplos do peso esperado para a proteína $\text{{}_6\text{His-CITO}}$ ($\cong 11\text{kDa}$), foi suposto que essas bandas seriam multímeros da mesma. Há ainda a possibilidade de que essas bandas com maior massa molecular sejam correspondentes a proteínas das bactérias, que estão sendo reconhecidas de maneira inespecífica pelo anticorpo. A eluição do domínio recombinante também foi bem sucedida, entretanto, ainda não foram padronizadas quais as melhores condições para essa purificação, já que para os objetivos desse trabalho não houve a necessidade da proteína solúvel. Foi utilizado o domínio $\text{{}_6\text{His-CITO}}$ permanecendo ligado à resina Ni-NTA-Agarose para os ensaios de “pull-down”, os quais serão discutidos a seguir.

3 Identificação de ligantes de $\text{{}_6\text{His-CITO}}$ (ensaios de “pull-down”)

Para verificar a interação *in vitro* do domínio citoplasmático de Sema5B com outras proteínas presentes no sistema nervoso central, foram utilizados extratos protéicos provenientes de cérebro de camundongo que foram incubados com a proteína recombinante $\text{{}_6\text{His-CITO}}$ imobilizada à resina Ni-NTA-Agarose. Como pode ser visto na figura 8, várias bandas presentes no extrato ligaram-se à resina contendo $\text{{}_6\text{His-CITO}}$. Já que essas mesmas bandas não se ligaram à resina Ni-NTA-Agarose vazia, é possível concluir que os ligantes obtidos interagiram especificamente com o domínio recombinante $\text{{}_6\text{His-CITO}}$.

Assim, estando o ensaio de “pull down” padronizado, ele foi repetido e os ligantes foram então separados em eletroforese bidimensional (Figura 9). Após coloração com prata, alguns “spots” de possíveis proteínas candidatas a serem ligantes de $\text{{}_6\text{His-CITO}}$ puderam ser visualizados e os 10 “spots” mais intensos foram

removidos do gel. Destes, somente 7 “spots” apresentaram massa suficiente para a identificação por PMF (“Peptide Mass Fingerprint”). As proteínas identificadas encontram-se na tabela II. Conhecendo a identidade e a função das candidatas (tabela III) já é possível analisar se as suas interações com o domínio recombinante fazem sentido, bem como discutir um pouco sobre o provável papel biológico destas interações.

Antes disso, deve-se destacar para a importância do “score” obtido após análise dos resultados através do programa MASCOT. Esse valor é dado por $-10\log(P)$, onde P é a probabilidade do pareamento realizado (entre o PMF obtido e o PMF conhecido, depositado em bancos de dados) ser um evento ao acaso. Normalmente, considera-se que valores de “score” maiores que 67 são significativos, ou seja, indicam que a identidade obtida para aquele “spot” seja confiável (http://www.matrixscience.com/help/scoring_help.html).

Das proteínas identificadas, as que apresentaram valores de “score” significativos foram as dos “spots” 2, 3 e 4, identificadas como beta-2A-tubulina, ATP sintase (subunidade beta) e actina citoplasmática 1, respectivamente (tabela II). Destas, as que despertaram maior interesse foram beta-2A-tubulina (constituente dos microtúbulos) e actina (componente do citoesqueleto e mediadora da motilidade celular), pois elas são proteínas que fazem parte do citoesqueleto, o que faz sentido uma vez que o ensaio foi feito com uma proteína recombinante derivada da sequência de um domínio citoplasmático.

É interessante notar que as tubulinas são encontradas nas células na forma de heterodímeros de cadeias alfa e beta (LUDUEÑA, 1993), sugerindo que a identificação do “spot” 1 como sendo cadeia alfa-1C de tubulina seja real, mesmo que o valor do “score” esteja baixo (Score=34). Assim, os resultados do ensaio de “pull down” sugerem que o domínio citoplasmático de Sema5B se liga a um heterodímero de tubulina e também à actina. Isso permite especular que essa semaforina em questão, ao se ligar a um ligante extracelular (ainda desconhecido) sinalize, através de seu domínio intracelular, para que a célula altere de alguma forma o seu citoesqueleto. Nesse contexto, Sema5B funcionaria como uma proteína receptora. Sema5B também pode funcionar como um ligante e deflagrar um sinal de remodelação de citoesqueleto em uma outra célula, ao se ligar em uma plexina (ainda desconhecida), por exemplo, modulando respostas características das

semaforinas, tais como colapso do cone de crescimento e navegação axonal. O exato desempenho dessas funções em ambos os contextos ainda precisam ser elucidados.

Quanto à ATP sintase (subunidade beta), correspondente ao “spot” 3, é possível dizer que esta identificação é confiável, uma vez que o valor do “score” correspondente foi alto (75). Entretanto, essa interação não apresenta um significado biológico, pois as proteínas envolvidas encontram-se em compartimentos celulares que não se comunicam: Sema5B é uma proteína integral de membrana e a subunidade beta da ATP sintase encontra-se na membrana interna das mitocôndrias. Provavelmente, ao se usar extrato de cérebro, onde células sofreram lise, a subunidade da ATP sintase em questão ficou disponível e interagiu de maneira artificial com ϵ His-CITO, nas condições do ensaio.

Outro ligante obtido foi a glicoproteína YE1/48, presente na superfície de células T e também em células NK (“natural killer”) (CHAN & TAKEI, 1989; YOKOYAMA *et al.*, 1990), células que normalmente não estão presentes no sistema nervoso central. Por essa última afirmação e pelo baixo valor do “score” (37), pode-se dizer que essa identificação talvez não esteja correta, já que não faz sentido obter esse ligante nas condições utilizadas.

Finalmente, os “spots” 8 e 10 tiveram a mesma identificação: proteína precursora de Sema3B. É interessante notar no gel, após eletroforese bidimensional (Figura 9), que esses “spots” possuem o mesmo pI (ponto isoelétrico), porém suas massas moleculares são distintas. O “spot” 8 possui cerca de 11kDa, enquanto que o “spot” 10 tem um pouco mais de 20kDa. As massas moleculares desses dois ligantes, assim como as suas intensidades (altas), sugerem que esses “spots” possam ser correspondentes ao ϵ His-CITO (“spot” 10) e seu dímero (“spot” 8). Entretanto, não foi possível encontrar uma explicação para a identificação destes “spots” como sendo Sema3B ao invés de Sema5B. Os valores muito baixos dos “scores” (16 e 20) indicam que esse pareamento pode ter sido ao acaso e que a identidade dos ligantes não deve ser confiável. Pelo fato destes “spots” possuírem massa molecular baixa, o número de fragmentos que eles produzem após a digestão com tripsina é pequeno, o que impede um pareamento mais eficiente para análise por PMF.

De fato, os ligantes obtidos mais interessantes e que apresentaram um significado biológico foram as subunidades de tubulina e a actina. Ambos, microtúbulos e actina, parecem operar de maneira sinérgica para mediar migração neuronal e/ou axonal. Entretanto, ainda não se sabe exatamente como isso é coordenado em resposta a um sinal extracelular (revisado em AYALA *et al.*, 2007).

Como mencionado anteriormente, essas interações podem indicar uma função de Sema5B como uma proteína receptora. Especula-se que Sema5B se ligue a essas proteínas através do seu domínio citoplasmático e altere o citoesqueleto da célula onde ela se encontra. Recentemente, o sinal de Sema5B como ligante foi abordado. Kenneth e colaboradores (KENNETH *et al.*, 2007) mostraram que o domínio Sema de Sema5B induz o colapso do cone de crescimento através da indução de um influxo de Ca^{+2} , causando um aumento deste cátion no interior da célula. Os sinais posteriores que são deflagrados envolvem a atividade de calpaína e calcineurina, que em conjunto modulam o citoesqueleto promovendo o colapso do cone de crescimento (KENNETH *et al.*, 2007).

No presente trabalho também foi decidido investigar se existem diferenças entre interações do domínio citoplasmático de Sema5B no sistema nervoso em desenvolvimento (estágio embrionário) em comparação com o cérebro maduro (adulto). Sabe-se que o RNAm de Sema5B é expresso em E10 (camundongo embrião de 10 dias), mas sua abundância diminui até o nascimento. Encontra-se esse mesmo RNAm em camundongos adultos, exclusivamente no cérebro (ADAMS *et al.*, 1996). Assim, Sema5B está presente tanto em cérebro de camundongos embriões quanto em cérebro de camundongos adultos. Trabalhos com outras semaforinas transmembrânicas sugerem que elas estão envolvidas na navegação axonal durante o desenvolvimento e que, no sistema nervoso maduro, elas participam na manutenção e no funcionamento de sinapses (revisado em MANN *et al.*, 2007). Por exemplo, alguns membros das semaforinas de classe 4 interagem através de seu domínio citoplasmático com a proteína pós-sináptica PSD-95 (“post-synaptic density 95 kDa protein”) e esse tipo de ligação agrupa e localiza estas semaforinas na membrana pós-sináptica de neurônios hipocâmpais em cultura (BURKHARDT *et al.*, 2005). Semaforinas de classe 6 (proteínas integrais de membrana) também foram encontradas em sinapses (BURGAYA *et al.*, 2006).

Tendo em vista esses dados da literatura que mostram funções distintas para semaforinas integrais de membrana no cérebro embrionário e adulto, realizamos ensaios de “pull-down”, utilizando, em paralelo, extrato de cérebro de embriões de camundongos e extrato de cérebro de camundongos adultos. Para avaliar os ligantes de ^6His -CITO nos dois contextos, comparamos o padrão de “spots” obtidos após os “pull-down” e eletroforese bidimensional para os dois tipos de extrato. Esse resultado está apresentado na figura 10 e nenhuma diferença significativa pôde ser visualizada entre os ligantes dos diferentes extratos. Contudo, deve-se notar que um número muito maior de “spots” foi obtido nesses ensaios do que no ensaio anterior (Figura 9), apesar do protocolo utilizado ter sido idêntico. Assim, estes últimos resultados são ainda preliminares e estão sendo repetidos para que uma análise mais confiável seja feita dos ligantes diferenciais do domínio citoplasmático em cérebro adulto e cérebro embrionário.

Como pôde ser visto, esse trabalho em questão iniciou o estudo da semaforina 5B, através da produção de ^6His -CITO. Esse domínio recombinante constitui uma ferramenta importante que foi utilizada em ensaios de ligação *in vitro* para a investigação dos ligantes deste domínio. Sem dúvida, a identificação de proteínas ligantes de Sema5B pode nos trazer pistas valiosas sobre a sua participação em processos fisiológicos e patológicos, como desenvolvimento e regeneração do sistema nervoso central.

7 PERSPECTIVAS

O presente trabalho deixou em aberto várias questões sobre a Semaforina 5B e sobre seus ligantes que precisam ser respondidas. Assim, outros projetos do grupo já estão em andamento para abordar essas questões.

Com o domínio recombinante ϵ His-CITO em mãos, pretende-se utilizá-lo na imunização de animais (coelhos e camundongos) para obtenção de anticorpos específicos, capazes de reconhecer essa proteína em diferentes ensaios.

As tentativas para construções para o domínio SEMA+PSI também continuam e a expressão e purificação desse domínio serão importantes para geração de anticorpos e realização de ensaios de “pull down”. Essa seria uma forma de se obter importantes informações sobre a função extracelular da semaforina 5B.

Pretende-se também confirmar as interações obtidas com as proteínas de citoesqueleto e repetir os ensaios de “pull down” com extratos de cérebro de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento para avaliar os ligantes de Sema5B nos diferentes contextos. Extratos de diferentes linhagens celulares (neuronal e gliais) também serão testados nesse tipo de experimento.

8 CONCLUSÃO

- O domínio citoplasmático da proteína semaforina5B foi expresso e purificado com sucesso;
- Ensaio de “pull-down” foram realizados com a proteína recombinante obtida, 6His-CITO, e possíveis ligantes para esse domínio são as proteínas tubulina e actina;
- Na comparação do “pull-down” com extratos de cérebro de camundongo adulto e embrião, parece não haver diferenças de interações entre 6His-CITO e seus ligantes nessas duas fases do desenvolvimento;
- Todo esse trabalho permitiu a padronização de várias técnicas de biologia molecular no laboratório.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.C., TUCKER, R.P. The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev Dyn* 218:280-99, 2000.

ADAMS, R.H., BETZ, H., PUSCHEL, A.W. A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during early embryogenesis. *Mech Dev* 57:33-45, 1996.

ADAMS, R.H., LOHRUM, M., KLOSTERMANN, A., BETZ, H., PÜSCHEL, A.W. The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J.* 16:6077-6086, 1997.

ARTIGIANI S, CONROTTO P, FAZZARI P, GILESTRO GF, BARBERIS D, GIORDANO S, COMOGLIO PM, TAMAGNONE L. Plexin-B3 is a functional receptor for Sema 5A. *EMBO Rep.* 5: 710-714, 2004.

AURANDT, J.; WELQUAN, L; GUAN, K.L; Semaphorin 4D activates the MAPK pathway downstream of Plexin-B1 *Biochem J*, v. 394(Pt2), 459-64, 2005.

AYALA, R., SHU, T., TSAI, L. Trekking across the Brain: The Journey of Neuronal Migration. *Cell* 128, 29 - 43, 2007

BURGAYA, F., FONTANA, X., MARTINEZ, A., MONTOLIO, M., MINGORANCE, A., SIMO, S., DEL RIO, J.A., SORIANO, E. Semaphorin 6C leads to GSK-3-dependent growth cone collapse and redistributes after entorhino-hippocampal axotomy. *Mol. Cell. Neurosci.* 2006.

BURKHARDT, C., MULLER, M., BADDE, A., GARNER, C.C., GUNDELFINGER, E.D., PUSCHEL, A.W. Semaphorin 4B interacts with the post-synaptic density protein PSD-95/SAP90 and is recruited to synapses through a C-terminal PDZ-binding motif. *FEBS Lett.* 579, 3821–3828, 2005.

CASTELLANI, C., ROUGON, G. Control of semaphoring signaling. *Curr Opin Neurobiol* 12:532-541, 2002.

CHAN, P.Y., TAKEI, F. Molecular cloning and characterization of a novel murine T cell surface antigen, YE1/48. *J Immunol*, 142(5):1727-36, Mar 1989.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, p. 629-635, 2002

FIORE, R.; RAHIM, B.; CHRISTOFFELS, V. M.; MOORMAN, A.F.M.; PÜSCHEL, A.W. Inactivation of the Sema5a gene results in embryonic lethality and defective remodeling of the cranial vascular system. *Mol Cell Biol*, v. 25(6), 2310-19, 2005.

GIGER, R.J.; KOLODKIN, A.L. Silencing the siren: guidance cue hierarchies at the CNS midline. *Cell* 105:1-4, 2001.

HALLORAM, M.C.; WOLMAN, M.A. Repulsin or adhesion: receptors make the call. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18: 533-540, 2006.

HUBER, A.B., KOLODKIN, A.L., GINTY, D.D., CLOUTIER, J.F. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complex and the control of axon growth and guidance. *Annu. Rev. Neurosci.*, 26: 509-563, 2003.

JIN, Z., STRITTMATTER, S.M. Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J. Neurosci.* 17: 6256-6263, 1997.

KAMIGUCHI, H., LEMMON, V. IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. *Curr Opin Cell Biol* 12:598-605, 2000.

KANTOR, D.B.; CHIVATAKAN, O., PEER, K., OSTER, S.F., INATANI, M., HANSEN, M.J., JOHN G.F., YAMAGUCHI, Y., SRETAVAN, D.W., GIGER, R.J., KOLODKIN, A.L. Semaphorin 5A is a Bifunctional Axon Guidance Cue Regulated by Heparan and Chondroitin Sulfate Proteoglycans. *Neuron*. v. 44, 961-975, 2004.

KENNEDY, T.E. Cellular mechanisms of netrin function: long-range and short-range actions. *Biochem Cell Biol* 78:569-75, 2000.

KENNETH, C.W. To, CHURCH, J., O'CONNOR, T.P. Combined activation of calpain and calcineurin during ligand-induced growth cone collapse. *Mol. Cell. Neurosci.* 36, 425–434, 2007.

KOLODKIN, A.L., MATTHES, D.J., O'CONNOR, T.P., PATEL, N.H., ADMON, A., BENTLEY, D., GOODMAN, C.S. Fascilin IV: sequence, expression and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron*, 9: 831-845, 1992.

KRUGER, R.P., AURANDT, J., GUAN, K. Semaphorins command cells to move. *Molecular Cell Biology*, v6, 789-800, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v. 227, p. 680-685, 1970.

LUDUEÑA, R.F. Are Tubulin Isotypes Functionally Significant. *Molecular Biology of the Cell*, v 4, 445-457, 1993.

MANN, F., CHAUVET, S., ROUGON, G. Semaphorins in development and adult brain: Implication for neurological diseases. *Progress in Neurobiology* 82 57–79, 2007.

MATTHES, D.J., SINK, H., KOLODKIN, A.L., GOODMAN, C.S. Semaphorin II can function as a selective inhibitor of specific synaptic arborization. *Cell*, 81: 631-639, 1995.

MUELLER, B.K. Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 351-388, 1999.

NEGISHI, M., OINUMA, I., KATOH, H. Plexins: axon guidance and signal transduction. *Cell Mol Life Sci* .;62(12):1363-71, 2005.

OSTER, S.F., BODEKER, M.O., HE, F., SRETAVAN, D.W. Invariant Sema 5A inhibition server as ensheathing function during optic nerve development, *Development* 130: 775-784, 2003.

PATEL B.N., VAN VACTOR, D.L. Axon guidance: the cytoplasmic tail. *Curr Opin Cell Biol* 14:221-9, 2002

PASTERKAMP, R.J., PESCHON, J.J., SPRIGGS, M.K., KOLODKIN, A.L. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature*,424: 398-405, 2003.

PÜSCHEL, A.W. Semaphorins: repulsive guidance molecules show their attractive side *Nature Neurosc.* 2:777-778, 1999a.

PÜSCHEL, A.W. Divergent properties of mouse netrins *Mech. Dev* 83:65-75, 1999b.

RANSCHT, B. Cadherins: molecular codes for axon guidance and synapse formation. *Int J Dev Neurosci* 18:643-51, 2000.

RAPER, J.A. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Cur Opin Neurobiol*, 10: 95-104, 2000.

ROHM, B., OTTEMEYER, A., LOHRUM, M., PÜSCHEL, A.W. Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech. Dev.*, 93:95-104, 2000a

ROHM, B., RAHIM, B., KLEIBER, B., HOVATTA, I., PÜSCHEL, A.W. The semaphorin 3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases. *FEBS Letters* 486:68-72, 2000b.

ROLLMANN, S.M., YAMAMOTO, A., GOOSSENS, T., ZWARTS, L., CALLAERTS-VÉGH, Z., CALLAERTS, P., NORGA, K., MACKAY, T.F., ANHOLT, R.R. The Early Developmental Gene Semaphorin 5c Contributes to Olfactory Behavior in Adult *Drosophila*. *Genetics* 176: 947–956, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning: A laboraroty manual, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA. 2001.

SEMAPHORIN NOMENCLATURE COMMITTEE. Unified Nomenclature for the Semaphorins/Collapsins. *Cell*, v97, 551-552, 1999.

SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-25, 2000.

TAMAGNONE, L.; COMOGLIO, P.M. Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol* 10:377-83, 2000

TAMAGNONE, L.; COMOGLIO, P.M. To move or not to move? Semaphorin signalling in the cell migration. *EMBO Rep.*, 5: 356-361, 2004.

TESSIER-LAVIGNE, M.; GOODMAN, C.S. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123-1133, 1996

WINBERG M.L., NOORDERMEER, J.N., TAMAGONE, L., COMOGLIO, P.M., SPRIGGS, M.K., TESSIER-LAVIGNE, M., GOODMAN, C.S. Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell*, 95:903-16,1998

WIT, J.; VERHAAGEN, J. Role of semaphorins in the adult nervous system. *Prog. Neurobiol.*, **71**: 249-267, 2003.

YOKOYAMA, W.M., KEHN, P.J., COHEN, D.I., SHEVACH, E.M. Chromosomal location of the Ly-49 (A1, YE1/48) multigene family. Genetic association with the NK 1.1 antigen. J Immunol. 145(7):2353-8, Oct 1990.

ZANATA, S.M., HOVATTA, I., ROHM, B., PÜSCHEL, A.W. (2002) Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. J Neurosci, v. 22, p. 471-7, 2002.

541 gccgtcatctcctctcagggggagctctatgcagccacagtcatt
 A V I S S Q G E L Y A A T V I 195
 586 gacttctccgggtcgggacccagccatctaccgcagcctgggcagt
 D F S G R D P A I Y R S L G S 210
 631 gggccaccgcttcgcactgccaggtataactccaaatggctcaat
 G P P L R T A Q Y N S K W L N 225
 676 gagccaaattttgtggcagcctttgacatcgggctgtttgcgtat
 E P N F V A A F D I G L F A Y 240
 721 ttcttctctcgggagaaatgccgtggagcatgattgtgggcgcact
 F F L R E N A V E H D C G R T 255
 766 gtgtactctcgggtggcccggtgtgcaagaatgatgtagggtggc
 V Y S R V A R V C K N D V G G 270
 811 cgtttctctgctggaggacacgtggaccacattcatgaaggcccg
 R F L L E D T W T T F M K A R 285
 856 ctcaactgctcccgcccgaggaggtcccttctactataatgag
 L N C S R P G E V P F Y Y N E 300
 901 ctgcagagtgccttccatctgcccagcaggacctcatctatggc
 L Q S A F H L P E Q D L I Y G 315
 946 gtcttcaccactaacgtaaacagcattgcggcttctgctgtctgc
 V F T T N V N S I A A S A V C 330
 991 gccttcaacctcagtgccatctccaaggetttcaatggccattt
 A F N L S A I S K A F N G P F 345
 1036 cgttaccagggaaaaccccgaggctgctggctcccaatcgccaat
 R Y Q E N P R A A W L P I A N 360
 1081 cccatccccaatttccagtgtggcactctgccggagactggcccc
 P I P N F Q C G T L P E T G P 375
 1126 aacgagaacctcacggagcgcagcctgcaggacgcacagcggctc
 N E N L T E R S L Q D A Q R L 390
 1171 ttctgatgagcgaagctgtgcagccagtgcaccagagccctgt
 F L M S E A V Q P V T P E P C 405
 1216 gtcacccaggacagcgtccgcttctcacatctcgtggtagacct
 V T Q D S V R F S H L V V D L 420
 1261 gtgcaagctaaggacacgctctatcacgtactctacataggcacg
 V Q A K D T L Y H V L Y I G T 435
 1306 gagtcgggtaccatcctgaaagcgtgtccacggccagccgcagc
 E S G T I L K A L S T A S R S 450
 1351 ctccgtggctgctacctggaggagctacatgtgctgcctcctggg
 L R G C Y L E E L H V L P P G 465
 1396 cgcttgaacctctgcggagcctgcgcatectgcacagcgcgcgt
 R L E P L R S L R I L H S A R 480
 1441 gcgctcttcgtgggattgagcgcacaggggtgctgcggtatccactg
 A L F V G L S D R V L R I P L 495
 1486 gagagggtgttcggcctatcatagccagggggcatgcctgggagca
 E R C S A Y H S Q G A C L G A 510

1531 cgggacccatactgcggtggtgggatgggaagcggcaactttgcagc
 R D P Y C G W D G K R Q L C S 525
 1576 acgcttgaagacagttccaacatgagcctgtggatccagaacatc
 T L E D S S N M S L W I Q N I 540
 1621 acaacctgtcctgttacgaaatgtgacacgggatgggggcttcggc
 T T C P V R N V T R D G G F G 555
 1666 ccatggtcaccatggaaaccgtgtgagcacttagatggagacaac
 P W S P W K P C E H L D G D N 570
 1711 tcgggttcttgctgtgccgggcccagatcctgtgactccccaagg
 S G S C L C R A R S C D S P R 585
 1756 cctcgtgtgtggggcctcgagtgcctggggccatccatccatatt
 P R C G G L E C L G P S I H I 600
 1801 gccaatgtctccaggaaatggggcggtggaccgcatggtcatcgtgg
 A N C S R N G A W T A W S S W 615
 1846 gctcagtgacgacgctcctgtgggatcggttccagggtccgtcag
 A Q C S T S C G I G F Q V R Q 630
 1891 cgaagttgcagcaacccggcgccccgccatggggggccgcatttgc
 R S C S N P A P R H G G R I C 645
 1936 gtgggcaagagccgggaggagcggttctgtaatgaaaatacacct
 V G K S R E E R F C N E N T P 660
 1981 tgcccaagtgcctccttctgggttctcctgggggttctcctggagcaag
 C P V P I F W A S W G S W S K 675
 2026 tgcagcaacaactgtggaggcggtgcagtcgcgcacgcggttct
 C S N N C G G G V Q S R R R S 690
 2071 tgcgagaatggcaactcgtgcccggttgcggcgtggagttcaag
 C E N G N S C P G C G V E F K 705
 2116 acctgcaaccccgaggttgcctgggaagtgcgacgcaacacaccc
 T C N P E A C P E V R R N T P 720
 2161 tggacgccctgggtgcccgtaacgtgacccaggggtggagcgcgc
 W T P W L P V N V T Q G G A R 735
 2206 caggagcagcgattccgcttcacctgccgcgcgcgctgcgcggac
 Q E Q R F R F T C R A P L P D 750
 2251 ccgcacggtctgcagttcggcaagaggaggacagagaccaggact
 P H G L Q F G K R R T E T R T 765
 2296 tgccccgcagacggcaccggagcctgcgacaccgacgccttggtg
 C P A D G T G A C D T D A L V 780
 2341 gaggatctcctgcgcagcgggagcacgtcaccacacactctgac
 E D L L R S G S T S P H T L N 795
 2386 ggaggetggtccacctggggcccgtggtcatcctgctcccgggac
 G G W A T W G P W S S C S R D 810
 2431 tgcgagctgggttccgcgtccgcaagagaacttgtaccaacccg
 C E L G F R V R K R T C T N P 825
 2476 gaggctcgcaacggggggttgcctgcgtgggagacgctgcggag
 E P R N G G L P C V G D A A E 840

2521 taccaagactgcaaccacaggtctgccaagtgcgggggtgcttgg
 Y Q D C N P Q A C P V R G A W 855
 2566 tcttgctggaccgcatggtcccagtgctcagcatcctgcgggtggt
 S C W T A W S Q C S A S C G G 870
 2611 ggccactatcaacgcacccgttctctgcaccagccccgccccatcc
 G H Y Q R T R S C T S P A P S 885
 2656 ccaggtgaggacatctgcctcggcctgcacacggaggaggcccta
 P G E D I C L G L H T E E A L 900
 2701 tgttcaacacaggcctgccaagaaggctgggtcactgtggtctgag
 C S T Q A C P E G W S L W S E 915
 2746 tggggtgtctgcactgaggatggggcccagagccggagccggagc
 W G V C T E D G A Q S R S R S 930
 2791 tgtgaggagcttctcccaggaccaggtgcctgtgttggaacagc
 C E E L L P G P G A C V G N S 945
 2836 agccagagccggccctgcccctacagtgagattcctgtcatccta
 S Q S R P C P Y S E I P V I L 960
 2881 cctgcttccagtggtggaggagaccaccagctgtggaggggttcaat
 P A S S V E E T T S C G G F N 975
 2926 ctcatccacctgatagtcactgggtgtgtcctgcttctggtttct
 L I H L I V T G V S C F L V S 990
 2971 gggctcttgaccttggcagtgtagctcttggccagcactgccag
 G L L T L A V Y L S C Q H C Q 1005
 3016 cgccagttctcaggagtcacgcttgtccatcctgccacacctaac
 R Q S Q E S T L V H P A T P N 1020
 3061 cacttgactacaagggtggggcaccaccaagaatgagaagtac
 H L H Y K G G G T P K N E K Y 1035
 3106 acccctatggaattcaagacactgaacaagaacaacttaatccct
 T P M E F K T L N K N N L I P 1050
 3151 gatgacagagccaacttctaccactgcagcagaccaatgtgtat
 D D R A N F Y P L Q Q T N V Y 1065
 3196 acaaccacgtactaccccagcccactgaacaagcccagcttccgg
 T T T Y Y P S P L N K P S F R 1080
 5' 3241 cctgaggcctcacctggacagcgctgtttccccaacagctga 3282 bp 3'
 P E A S P G Q R C F P N S * 1093 aa